Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale„ n. 168 del 20 luglio 1989 - Serie generale

Spedizione in abbonamento postale - Gruppo I (70%)

GAZZETTA UFFICIALE

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA **Roma - Giovedì, 20 luglio 1989** SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI NON FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DI GRAZIA E GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA 70 - 00100 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 85081

N. 51

MINISTERO
DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

DECRETO MINISTERIALE 3 febbraio 1989.

Approvazione dei metodi ufficiali di analisi per le conserve vegetali - parte generale.

SOMMARIO

MINISTERO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

METODI UFFICIALI DI ANALISI PER LE CONSERVE VEGETALI

DECRETI, DELIBERE E ORDINANZE MINISTERIALI

MINISTERO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

DECRETO 3 febbraio 1989.

Approvazione dei metodi ufficiali di analisi per le conserve vegetali - parte generale.

IL MINISTRO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

DI CONCERTO CON

I MINISTRI DELLE FINANZE, DELLA SANITÀ, DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

Visti l'art. 43 del regio decreto-legge 15 ottobre 1925, n. 2033, convertito nella legge 18 marzo 1926, n. 562, riguardante la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari e l'art. 108 del regolamento per la esecuzione dello stesso regio decreto-legge, approvato con regio decreto 1° luglio 1926, n. 1361, i quali prescrivono che le analisi occorrenti in applicazione delle norme contenute nel regio decreto-legge e nel regolamento suddetti dovranno essere eseguite, dai laboratori incaricati, con i metodi prescritti da questo Ministero, di concerto con quelli delle finanze e della sanità;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 26 marzo 1980, n. 327 «Regolamento di esecuzione della legge 30 aprile 1962, n. 283, e successive modificazioni, in materia di disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e bevande»;

Visti i decreti ministeriali 25 marzo 1961, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 105 del 29 aprile 1961 e 12 settembre 1974, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 29 del 30 gennaio 1975, concernenti «Metodi ufficiali di analisi delle conserve vegetali»;

Ritenuto opportuno porre a disposizione di tutti gli istituti e laboratori pubblici idonei metodi di analisi per il controllo delle conserve vegetali, perché le analisi da essi compiute risultino uniformi nei procedimenti e nei risultati;

Ritenuto altresì di procedere all'aggiornamento dei metodi di analisi di cui ai predetti decreti ministeriali 25 marzo 1961 e 12 settembre 1974;

Sentito il parere della commissione per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi per i prodotti agrari e per le sostenze di uso agrario - sottocommissione conserve vegetali, di cui al decreto ministeriale 11 febbraio 1981, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 204 del 27 luglio 1981;

Decreta:

Art. 1.

Sono approvati i «Metodi ufficiali di analisi per le conserve vegetali - parte generale», descritti nell'allegato al presente decreto.

Art. 2.

1. Sono abrogati i «Metodi ufficiali di analisi per le conserve vegetali», approvati col decreto ministeriale 25 marzo 1961, limitatamente alla parte descritta nel titolo I e nel titolo II.

2. È abrogato inoltre il decreto ministeriale 12 settembre 1974 con cui è stato approvato il supplemento n. 1 ai predetti metodi ufficiali di analisi.

3. Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, addì 3 febbraio 1989

Il Ministro dell'agricoltura e delle foreste
MANNINO

Il Ministro delle finanze
COLOMBO

Il Ministro della sanità
DONAT CATTIN

Il Ministro dell'industria, del commercio e dell'artigianato
BATTAGLIA

METODI UFFICIALI DI ANALISI PER LE CONSERVE VEGETALI

DISPOSIZIONI GENERALI CONCERNENTI I REATTIVI E L'APPARECCHIATURA DA UTILIZZARE SECONDO I METODI DI ANALISI

1) Salvo specifiche indicazioni dei metodi di analisi, tutti i reattivi devono essere di purezza analitica (p.a.)

2) Le operazioni di soluzione, diluizione, risciacquo e lavaggio, menzionate nei metodi di analisi senza precisazioni sulla natura del solvente o del diluente, implicano l'impiego di acqua. Di norma l'acqua deve essere distillata o demineralizzata di purezza equivalente. In casi particolari, indicati nei metodi di analisi, essa deve essere sottoposta a procedimenti specifici di purificazione.

3) Tenuto conto dell'abituale equipaggiamento dei laboratori di controllo, l'apparecchiatura descritta nei metodi di analisi si limita agli strumenti ed agli apparecchi speciali o che impongano esigenze specifiche.

4) Il risultato deve essere espresso secondo le indicazioni fornite dai metodi di analisi con un numero appropriato di cifre significative.

5) per bilancia analitica si intende una bilancia con la sensibilità di 0,0001 g.

   per bilancia tecnica si intende una bilancia con la sensibilità di 0,01 g.

ABBREVIAZIONI E SIMBOLI USATI NEL TESTO

A A	= assorbimento atomico
b.m.	= bagno maria
°C	= grado centigrado
ca.	= circa
conc.	= concentrato
d_{20}	= densità a 20°C
kg	= chilogrammo
g	= grammo
GC	= gas-cromatografia
h	= ora
hl	= ettolitro (10^2 l)
HPLC	= cromatografia liquida ad alta pressione
IR	= infrarosso
l	= litro
m	= metro
M	= fattore di molarità
mA	= milli Ampère
meq	= milli equivalenti
min	= minuto primo
mg	= milligrammo (10^{-3} g)
ml	= millilitro (10^{-3} l)
nm	= nanometro (10^{-9} m)

p.e.	= punto di ebollizione
p.f.	= punto di fusione
pH	= logaritmo decimale dell'inverso della concentrazione idrogenionica
m/m	massa/massa
ppm	= parti per milione (10^{-6})
ppb	= parti per miliardo (10^{-9})
ps	= peso specifico
m/v	= massa/volume
Rf	= rapporto fronte macchia/solvente
s	= secondo
t	= temperatura
TLC	= cromatografia su strato sottile
UV	= ultravioletto
U.I.	= unità internazionale
v/v	= volume/volume
µg	= gamma o microgrammo (10^{-6}g)
µm	= micron o micrometro (10^{-6}m)
λ	= lunghezza d'onda
µl	= microlitro (10^{-6}l)
Ø	= diametro

TABELLA di corrispondenza tra i metodi descritti nel Titolo II dell'allegato al D.M. 25 marzo 1961, ora abrogati, e quelli riportati nel Titolo II dell'allegato al presente decreto.

TITOLO II D.M. 25 marzo 1961	TITOLO II D.M. 3 febbraio 1989
1.	1.
2.	6. - 7.
3.	8.
4.	2.
5.	11.
6.	12.
7.	13. - 14.
8.	15.
9.	16.
10.	17.
11.	18.
12.	19. - 20. - 21. - 22. - 23.
13.	33.
14.	24. - 25. - 26.
15.	27. - 28. - 29. - 30. - 31.
16.	32.
17.	34.
18.	35.

PARTE GENERALE

TITOLO I

PRELIEVO DEI CAMPIONI DA SOTTOPORRE ALL'ANALISI

Per quanto riguarda le norme da seguirsi nel prelievo dei campioni da sottoporre all'analisi ed alla stesura dei relativi verbali ci si deve attenere a quanto riportato nel D.P.R. 26 marzo 1980 n° 327, Titolo I e relativo Allegato A.

TITOLO II

DETERMINAZIONI ANALITICHE DI CARATTERE GENERALE

1. - Esame macroscopico ed organolettico della merce
(Recipiente e contenuto)

Qualora si debba accertare la sterilità del prodotto ed eseguire il conteggio delle muffe, il campione ancora chiuso deve essere inviato, per il prelievo del materiale, al laboratorio incaricato dell'analisi microbiologica.

Prima di aprire il campione, si deve eseguire l'esame esterno del recipiente (etichetta, litografia, indicazioni in rilievo, spandenza, tic-tac, gonfiore, arrugginimento, ecc.).

Devesi anche verificare l'aggraffatura prima e dopo l'apertura del recipiente.

All'apertura si esaminano le condizioni interne del recipiente (verniciatura, corrosione, ecc.) le caratteristiche organolettiche del prodotto (colore, sapore, odore, consistenza) e l'eventuale presenza di sostanze grossolane, estranee alla composizione della conserva (piccioli, foglie, noccioli, vermi, insetti, ecc.).

Prima dell'analisi il campione deve venire accuratamente omogeneizzato; nel caso di prodotti costituiti da parti liquide e solide, si procede come indicato alle singole voci.

2. - Esame microscopico

1. OGGETTO

Il metodo consente di individuare la natura delle sostanze insolubili presenti nel prodotto, siano esse elementi caratteristici di ogni vegetale, siano parassiti animali e vegetali.

2. PRINCIPIO

L'osservazione è principalmente rivolta alla forma ed alla dimensione delle cellule del periderma e del mesocarpo nonchè ai vasi ed agli altri elementi caratteristici del pericarpo e dei semi.

3. REATTIVI

3.1. Liquido di Lugol. Sciogliere in 300 ml di acqua 1 g di iodio e 2 g di potassio ioduro.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Microscopio binoculare con ingrandimenti da 10 a 600 diametri.

5. MODO DI OPERARE

Allestire il preparato diluendo una piccola quantità del campione con acqua o glicerina; 1 o 2 gocce del preparato sono posate sul vetrino e osservate al microscopio (4.1) con adatti ingrandimenti. Nel caso si debba evidenziare la presenza di sostanze amidacee, diluire una piccola quantità di campione con liquido di Lugol (3.1).

3. - Determinazione del peso netto

1. OGGETTO

Il metodo permette la determinazione del peso netto del prodotto privo del contenitore.

2. PRINCIPIO

Il peso netto si determina sottraendo dal peso lordo il peso del contenitore vuoto.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Bilancia tecnica

5. MODO DI OPERARE

Pesare con la bilancia tecnica (4.1) il contenitore pieno, svuotarlo, del suo contenuto, lavarlo ed asciugarlo. Pesare il contenitore vuoto.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il valore del peso netto Pn (arrotondato al grammo) è dato da:

Pn = P - p

dove:

P = peso del contenitore pieno

p = peso del contenitore vuoto

4. - Determinazione del peso del prodotto sgocciolato

1. OGGETTO

Il metodo permette la determinazione del peso del prodotto separato dalla parte liquida per sgocciolamento su un setaccio di caratteristiche determinate.

2. PRINCIPIO

Il peso sgocciolato si determina sottraendo il peso del setaccio vuoto da quello del setaccio e del suo contenuto dopo sgocciolamento.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Setaccio n° 5 della serie italiana UNI n. 2331 (1980) (luce netta per maglia 2,8 mm) munito del piatto di raccolta (Ø 20 cm per scatole del formato fino a 1 Kg compreso, Ø 30 cm per scatole del formato superiore a 1 Kg fino a 5 Kg compreso)

4.2. Bilancia tecnica.

5. MODO DI OPERARE

Pesare il setaccio con il piatto di raccolta (4.1) e portare il prodotto a temperatura ambiente (20-25°C). Svuotare l'intero contenuto del recipiente sul setaccio senza piatto. Distribuire il contenuto uniformemente su tutta la superficie del setaccio. Nel caso di frutta sciroppata o all'acqua, i mezzi frutti presenti devono essere posti sul setaccio con la parte convessa rivolta verso l'alto. Inclinare leggermente il setaccio senza muovere il contenuto per facilitare lo sgocciolamento e lasciare sgocciolare per 2 min. Riporlo sul piatto di raccolta e pesare il tutto.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il valore del peso del prodotto sgocciolato Ps, arrotondato al grammo, è dato da

Ps = P - p

P = peso del setaccio con il piatto ed il prodotto sgocciolato

p = peso del setaccio vuoto con il piatto

5. - Determinazione dei solidi totali o sostanza secca

1. OGGETTO

Il metodo permette di determinare i solidi totali o sostanza secca del prodotto in esame.

2. PRINCIPIO

I solidi totali si determinano per via diretta, facendo evaporare il prodotto a 70°C a pressione ridotta, oppure sempre a 70°C, a pressione normale.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Capsula di porcellana o metallica a fondo piatto (Ø 75 mm circa)

4.2. Bilancia analitica

4.3. Stufa a vuoto termoregolata a 70°C ± 2°C

4.4. Stufa ad aria termoregolata a 70°C ± 2°C

5. MODO DI OPERARE

5.1. Essiccazione a 70°C a pressione ridotta. Pesare (4.2) una determinata quantità di sostanza (1-2 g a seconda dell'umidità) distribuirla uniformemente sul fondo di una capsula (4.1) preventivamente tarata. Se la sostanza è molto pastosa si può diluire con poca acqua, evaporando poi a b.m. l'acqua aggiunta, per evitare che nella stufa a vuoto il prodotto entri in ebollizione provocando spruzzi. Porre poi la capsula in stufa riscaldata a 70°C con depressione di 650-660 mm di mercurio (4.3). Essiccare per almeno 4 h, raffreddare in essiccatore e pesare.

La sostanza secca da pesare deve aggirarsi intorno a 0,5 g; tale quantità corrisponde a circa 13 mg per cm^2.

5.2. Essiccazione a 70°C a pressione normale. Si opera con la medesima tecnica descritta in (5.1) effettuando l'essiccazione in stufa ad aria (4.4) per 4 h, prolungandone la durata se necessario.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il valore percentuale dei solidi totali St, arrotondato alla seconda cifra decimale, è dato da

$$St = \frac{100\ (c - a)}{(b - a)},$$

dove:

a = capsula vuota

b = capsula con il prodotto prima dell'essiccamento

c = capsula con il prodotto dopo l'essiccamento

p = peso della sostanza in g

6. - Determinazione dell'umidità

1. OGGETTO

L'umidità delle conserve vegetali rappresenta convenzionalmente il valore percentuale complementare a quello dei solidi totali e di norma viene ottenuta per differenza.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

la percentuale in peso di umidità, espressa con due cifre decimali, è data da:

$$\% \ H_2O = 100 - St$$

dove: St = % solidi totali

7. - Determinazione dell'umidità nei prodotti disidratati

1. OGGETTO

Per prodotti a basso contenuto di acqua, come gli essiccati, l'umidità viene determinata direttamente con il metodo Karl Fischer.

2. PRINCIPIO

Determinazione dell'acqua con uno speciale reattivo iodo-solforoso in presenza di alcool metilico con rilevamento del punto finale della titolazione mediante metodo elettrometrico.

3. REATTIVI

3.1. Reattivo di Karl Fischer. Il reattivo si trova già pronto in commercio o si prepara come segue: sciogliere 133 g di I_2 in 425 ml di piridina anidra in un matraccio privo di umidità e con tappo di vetro. Aggiungere 425 ml di metanolo anidro, raffreddare sotto i 4°C e fare sciogliere per gorgogliamento 102-105 g di SO_2. Agitare bene e lasciare riposare per almeno 12 h. Il reattivo è sufficientemente stabile ma deve essere normalizzato ad ogni serie di determinazioni.

3.2. Metanolo anidro. Il reattivo si trova già pronto in commercio o si prepara distillando su magnesio il metanolo assoluto commerciale.

3.3. Sodio tartrato biidrato. "60 mesh" (1 g corrisponde a 156,6 mg di H_2O).

4. APPARECCHIATURA

4.1. Titolatore Karl Fischer.

5. MODO DI OPERARE

5.1. Titolazione del reattivo (3.1)

Nel recipiente di titolazione si pongono 25-50 ml di alcool metilico anidro (3.2) fino a coprire gli elettrodi. Mettere in funzione l'agitatore magnetico regolando la velocità in modo da ottenere una buona agitazione, senza spruzzi, facendo in modo che l'ancoretta introdotta nel recipiente non tocchi gli elettrodi. Si titola con il reattivo (3.1) fino al raggiungimento del punto finale evidenziato dal brusco innalzamento della corrente. Verso la fine titolare lentamente, fino a che 0,1 ml di reattivo (3.1) aggiunto lascino alto il passaggio di corrente (mA) per 60 s.

In molti apparecchi la fine della titolazione viene segnalata automaticamente.

Si aggiungono circa 0,5 g di sodio tartrato biidrato (3.3), esattamente pesati e si titola nuovamente.

Il titolo del reattivo (3.1) in mg H_2O/ml sarà:

$$f = \frac{p \cdot 0,156}{b - a}$$

dove:

p = mg di sodio tartrato biidrato

a = ml del reattivo 3.1 per titolare il metanolo

b = ml del reattivo 3.1 per titolare metanolo + sodio tartrato biidrato.

5.2. Determinazione dell'H_2O nel campione.

Si introducono nel recipiente di titolazione 25-50 ml di metanolo (3.2) che si titolano col reattivo (3.1) e dopo, rapidamente si aggiunge una quantità esattamente pesata della sostanza in esame. Si titola come indicato sopra (vedi 5.1.).

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La percentuale in peso di umidità espressa con due cifre decimali è data da:

$$\% \text{ di } H_2O = \frac{f\,(b - a)}{10\,p}$$

dove: f = titolo del reattivo (3.1)

a = ml del reattivo (3.1) per titolare il metanolo

b = ml del reattivo (3.1) per titolare il metanolo + il campione

p = peso in g del campione

Nota

L'apparecchiatura nuova o non usata di recente non fornisce dati attendibili per l'umidità in essa presente; è necessario in tal caso ripetere più volte la determinazione in modo da essiccare tutto il sistema di titolazione.

8. - Determinazione del residuo secco solubile per via rifrattometrica (residuo ottico)

1. OGGETTO

Il metodo permette di calcolare per via rifrattometrica il residuo secco solubile, inteso come percentuale in peso di saccarosio di una soluzione di saccarosio avente lo stesso indice di rifrazione del prodotto analizzato. La presenza di aminoacidi, di sali di acidi organici, di flavonoidi e di sostanze minerali fa variare l'indice di rifrazione. Nel caso di diluizione del prodotto, il metodo non tiene conto della presenza dei solidi insolubili e dell'assorbimento delle sostanze solubili da parte di questi.

2. PRINCIPIO

Il residuo secco solubile si determina per via indiretta deducendolo dal valore del suo indice di rifrazione.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Rifrattometro del tipo Abbe provvisto di una scala indicante le percentuali in peso di saccarosio con una tolleranza dello 0,1. Esso deve essere concepito in modo da permettere la facile e rapida introduzione dei campioni e da poter essere agevolmente pulito.

Il rifrattometro deve essere provvisto di un termometro la cui scala si estenda almeno da +15°C a +25°C nonchè di un ultratermostato a

circolazione d'acqua che permetta di effettuare le misurazioni a una temperatura di +20°C con una approssimazione di +0,5°C e di un dispositivo di illuminazione.

Le istruzioni operative riguardanti lo strumento devono essere osservate rigorosamente, specie per quanto riguarda la scala di gradazione e l'intensità della fonte luminosa.

5. MODO DI OPERARE

5.1. Preparazione del campione

5.1.1. Prodotti liquidi e limpidi.

Mescolare con cura e procedere alla determinazione.

5.1.2. Prodotti semidensi, puree, succhi di frutta con sostanze in sospensione.

Omogeneizzare il campione medio di laboratorio dopo averlo mescolato con cura. Passare una parte del campione attraverso una garza asciutta piegata in quattro e, dopo aver eliminato le prime gocce del filtrato, procedere alla determinazione sul prodotto passato.

5.1.3. Prodotti densi (marmellate, gelatine, confetture, ecc.).

Se non si è potuto operare direttamente sul prodotto preventivamente omogeneizzato, pesare 40 g del prodotto, con una tolleranza di 0,01 g, in un bicchiere da 250 ml ed aggiungere 100 ml di acqua.

Far bollire dolcemente per due o tre min agitando con una bacchettina di vetro. Raffreddare e versare il contenuto del bicchiere in un matraccio tarato da 200 ml, portare a volume e mescolare con cura. Dopo aver atteso 20 min, filtrare attraverso un filtro a pieghe o imbuto di Buchner. Effettuare la determinazione sul prodotto filtrato.

5.1.4. Prodotti congelati .

Dopo scongelamento del prodotto e separazione dei noccioli e delle logge carpellari, mescolare il prodotto con il liquido formatosi in fase di scongelamento ed operare conformemente ai punti (5.1.2.) e (5.1.3.).

5.1.5. Prodotti secchi o prodotti contenenti frutti interi o in pezzi.

Dividere la parte del campione di laboratorio in piccoli pezzi, eliminare i noccioli e le logge carpellari, mescolare con cura. Pesare da 10 a 20 g del prodotto in un bicchiere con una tolleranza di 0,01 g. Aggiungere una quantità di acqua uguale o superiore a 5 volte la massa del prodotto. Riscaldare a bagnomaria per 30 min agitando di tanto in tanto con una bacchettina di vetro. Dopo raffreddamento, rendere omogeneo il contenuto del bicchiere e versarlo quindi in un matraccio tarato da 100-200 ml (secondo la quantità del prelievo). Portare a volume e mescolare con cura.

Filtrare dopo 20 min in un recipiente asciutto ed effettuare la determinazione sul filtrato.

5.2. Portare il campione preparato sul prisma di base del rifrattometro avendo cura che, premendo i prismi l'uno contro l'altro, il prelievo copra uniformemente la superficie del vetro ed effettuare la misurazione conformemente alle istruzioni operative per l'apparecchio utilizzato.

Leggere la percentuale in peso di saccarosio con una approssimazione dello 0,1%.

Effettuare almeno due determinazioni sullo stesso campione preparato.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il tenore di residuo secco solubile, espresso convenzionalmente in grammi di saccarosio per cento grammi di prodotto, viene calcolato come segue:

6.1. Si utilizzano le indicazioni rifrattometriche in percentuale di saccarosio a lettura diretta.

6.2. Se la lettura non è effettuata alla temperatura di +20°C, si effettuano le correzioni indicate nella tabella allegata.

6.3. Se la misurazione è stata eseguita su una soluzione diluita, il tenore di residuo secco solubile è uguale a

$$P \times \frac{100}{E}$$

dove P è il peso, in grammi, di residuo secco solubile per 100 grammi

CORREZIONE DA EFFETTUARE QUANDO LA DETERMINAZIONE VIENE FATTA AD UNA TEMPERATURA DIVERSA DA 20°C E NEI LIMITI COMPRESI FRA 15° E 25°C

Temperatura °C	Saccarosio in grammi per 100 g di prodotto									
	5	10	15	20	30	40	50	60	70	75
					SOTTRARRE					
15	0,25	0,27	0,31	0,31	0,34	0,35	0,36	0,37	0,36	0,36
16	0,21	0,23	0,27	0,27	0,29	0,31	0,31	0,32	0,31	0,23
17	0,16	0,18	0,20	0,20	0,22	0,23	0,23	0,23	0,20	0,17
18	0,11	0,12	0,14	0,15	0,16	0,16	0,15	0,10	0,12	0,09
19	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,07	0,05
					AGGIUNGERE					
21	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
22	0,12	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
23	0,18	0,20	0,20	0,21	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22
24	0,24	0,26	0,26	0,27	0,28	0,28	0,28	0,28	0,29	0,29
25	0,30	0,32	0,32	0,32	0,34	0,36	0,36	0,36	0,36	0,37

di prodotto, indicato dal rifrattometro ed E è il peso, in grammi, di prodotto per 100 ml di soluzione.

9. - Determinazione dei solidi insolubili in acqua

1. OGGETTO

Il metodo permette di determinare la percentuale dei solidi totali non solubili in acqua.

2. PRINCIPIO

Estrazione con acqua delle parti solubili ed essiccazione in stufa del residuo ottenuto.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Bilancia tecnica

4.2. Bilancia analitica

4.3. Centrifuga da laboratorio

5. MODO DI OPERARE

Si pesano 25-50 g di prodotto (4.1) eventualmente ridotto in purea omogenea a mezzo di mortaio o apparecchio meccanico, e si trasferiscono con acqua calda in un bicchiere da 400 ml; si aggiungono 200-250 ml di acqua e si fa bollire lentamente per pochi minuti. La sospensione si filtra quantitativamente su imbuto Büchner, preceden-

temente preparato con un disco di carta da filtro (Whatman n. 4, o equivalente) lavato con acqua calda, essiccato e tarato.

Una leggera aspirazione si applicherà alla beuta a vuoto sottostante solo alla fine della filtrazione. Si lava il filtro ed il suo contenuto con acqua calda fino a che l'acqua di lavaggio sia perfettamente neutra al tornasole (circa 900 ml di acqua). Il filtro viene quindi essiccato a 100°C fino a peso costante, raffreddato in essiccatore e pesato (4.2).

In particolari casi in cui si abbiano difficoltà di filtrazione è consigliabile l'impiego della centrifuga (4.3).

In tal caso circa 20 g di campione, opportunamente preparato, vengono estratti con diverse aliquote di acqua calda centrifugando dopo ciascuna aggiunta.

Il liquido supernatante è fatto passare attraverso un filtro tarato posto su Büchner. Se il filtro si intasa facilmente rallentando eccessivamente la filtrazione è opportuno continuare la filtrazione con un secondo filtro tarato. Dopo 4 o 5 lavaggi si trasferisce quantitativamente la sostanza insolubile residua sul filtro e quest'ultimo (insieme all'eventuale filtro precedentemente usato) posto in una capsula tarata viene essiccato per 2 h a 100°C, raffreddato in essiccatore e pesato con (4.2).

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il valore percentuale dei solidi insolubili in acqua(Si)è dato da:

$$Si = \frac{100\ (b - c)}{a}$$

dove: a = peso del campione

b = peso dell'insolubile più peso del filtro (o dei filtri) e della capsula

c = peso del filtro (o dei filtri) e della capsula

10. - Determinazione dei solidi solubili in acqua

1. OGGETTO

Il metodo permette di determinare la frazione non volatile del prodotto priva dei solidi insolubili in acqua.

2. PRINCIPIO

I solidi solubili si determinano per via indiretta conoscendo i solidi totali e quelli insolubili.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il valore dei solidi solubili Ss è data da:

Ss = St - Si

dove:

St = solidi totali

Si = solidi insolubili

11. - Determinazione del peso specifico

1. OGGETTO

Il metodo permette di determinare il peso specifico relativo o densità relativa, dato dal rapporto tra il peso di un determinato volume di sostanza in esame e il peso dello stesso volume di acqua distillata, a 20°C, pesati all'aria.

Nell'ambito delle conserve vegetali la determinazione è correntemente eseguita solo su prodotti liquidi.

2. PRINCIPIO

Si determina mediante il picnometro o la bilancia idrostatica o la bilancia Westphal o i densimetri.

A) Metodo del PICNOMETRO

4. APPARECCHIATURA

4.1. Picnometro da 50 o 100 ml di capacità

4.2. Stufa a secco regolata a 100 - 105°C

4.3. Bilancia analitica

4.4. Termostato regolato a 20°C

5. MODO DI OPERARE

Essiccare in stufa (4.2) il picnometro (4.1.) vuoto perfettamente pulito e risciacquato con acqua e, dopo raffreddamento in essiccatore, pesare (4.3). Riempire il picnometro con acqua bollita di recente e porre il tutto in termostato (4.4) per circa 30 min, in modo tale da uniformare la temperatura a 20°C.

Aggiustare accuratamente il livello dell'acqua nel picnometro ed asciugare la parte vuota del collo del picnometro con un piccolo rotolo di carta da filtro. Pesare quindi accuratamente. Essiccare nuovamente in stufa il picnometro dopo averlo vuotato del suo contenuto d'acqua. Dopo raffreddamento, riempirlo con la soluzione in esame, ripetendo tutte le operazioni eseguite con l'acqua.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il valore del peso specifico ps relativo a $\frac{20°C}{20°C}$ è dato da:

$$ps = \frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1}$$

dove:

P_1 = peso picnometro vuoto

P_2 = peso picnometro pieno d'acqua

P_3 = peso picnometro pieno del liquido in esame

B) Metodo della BILANCIA IDROSTATICA

4. APPARECCHIATURA

4.1. Bagno termostatato

4.2. Bilancia idrostatica sensibilità 0,1 mg completa di pescante e cilindro.

5. MODO DI OPERARE

Azzerare la bilancia (4.2). Riempire, fino al segno il cilindro con il prodotto opportunamente preparato. Porre il cilindro in bagno termostatato (4.1) a 20°C in modo da portare il campione a temperatura con il pescante immerso.
Sistemare il cilindro nella bilancia ed appendere il pescante avendo cura che non tocchi le pareti ed il fondo del cilindro.
Effettuare la pesata.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il valore del ps $\frac{20°C}{20°C}$ è dato direttamente dal valore letto sulla bilancia.

C) Metodo della BILANCIA DI WESTPHAL

4. APPARECCHIATURA

4.1. Bilancia di Westphal

4.2. Bagno termostatato

5. MODO DI OPERARE

Equilibrare la bilancia (4.1) senza pesi e con il pescante sospeso nell'aria. Riempire il cilindro con acqua e porlo in bagno termostatato (4.2) a 20°C in modo da portare l'acqua a temperatura. Immergere il pescante e porre il peso massimo all'estremità del braccio della bilancia (4.1). In queste condizioni equilibrare la bilancia stessa. Riempire un cilindro asciutto con il liquido in esame, portare alla temperatura di 20°C, immergere il pescante e riequilibrare la bilancia mediante gli opportuni pesi.

La posizione dei vari pesi permette di leggere direttamente il valore del peso specifico.

D) Metodo del DENSIMETRO

4. APPARECCHIATURA

4.1. Densimetro

4.2. Cilindri di vetro

4.3. Bagno termostatato regolato a 20°C

5. MODO DI OPERARE

Porre nel cilindro (4.2) la sostanza in esame e portare il tutto in bagno termostatato (4.3). Immergere lentamente il densimetro (4.1) ed agitarlo lievemente per eliminare le eventuali bollicine

d'aria aderenti allo strumento. Lasciare che il densimetro si fermi ed eseguire la lettura tenendo d'occhio il livello della superficie del liquido senza tener conto del menisco che si forma, per capillarità, intorno all'asta del densimetro.

NOTA

Per la determinazione del peso specifico di prodotti concentrati è necessario utilizzare picnometri a collo lungo.

12. - Determinazione delle impurità minerali
(Sabbia, terriccio, ecc.)

1. OGGETTO

Il metodo permette di determinare le materie inorganiche estranee dopo incenerimento del residuo della lisciviazione del prodotto in esame.

2. PRINCIPIO

Si determinano, levigando una quantità nota di prodotto, raccogliendo sul filtro senza ceneri il residuo sabbioso e incenerendo in muffola le eventuali piccole quantità di sostanza organica.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Levigatore costituito da un imbuto separatore da 2,5 l circa chiuso

con tappo a due fori per uno dei quali passa, a dolce strofinio, un tubo di vetro (Ø 5 mm) collegato nella parte posteriore ad un serbatoio di acqua posto a 50 cm di altezza, mentre per l'altro foro passa un tubo di vetro di efflusso.

In sostituzione del dispositivo descritto può essere impiegato un analogo apparecchio di levigazione.

4.2. Crogiuolo

4.3. Muffola

5. MODO DI OPERARE

Spappolare una determinata quantità di prodotto (pesata esattamente) in 500 ml di acqua riscaldata a 60 - 70°C e trasportare il tutto quantitativamente nel separatore (4.1). Lasciare riposare per 20 min. Far pescare per 3 mm circa il tubo di efflusso e porre il tubo di afflusso 3 cm sotto il livello della sospensione. Iniziare la levigazione. Abbassare gradatamente questo tubo mano a mano che il liquido si chiarifica. Proseguire fino ad eliminazione completa del materiale cellulosico (6-8 h). Trasferire quantitativamente il materiale sabbioso su un filtro senza ceneri, portare il filtro nel crogiuolo (4.2), bruciare, incenerire in muffola (4.3), raffreddare in essiccatore e pesare.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il valore percentuale delle impurità minerali Im è dato da:

$$Im = \frac{(P - p)}{g} \times 100$$

dove:

P = peso del crogiuolo con il residuo

p = peso del crogiuolo vuoto

g = peso del prodotto prelevato per la determinazione

Le impurità minerali per alcuni prodotti possono essere espresse in percento di residuo secco, eventualmente al netto di sale aggiunto.

13. - Determinazione delle ceneri

1. OGGETTO

Il metodo permette di determinare il residuo della combustione a 525°C del campione precedentemente essiccato.

2. PRINCIPIO

Combustione della materia organica e mineralizzazione del prodotto.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Capsula di quarzo o di platino a fondo piatto (Ø 80 mm circa)

4.2. Bilancia analitica

4.3. Bagno maria o stufa termostatica

4.4. Muffola

5. MODO DI OPERARE

Una determinata quantità di campione viene esattamente pesata (4.2) in capsula (4.1) previamente tarata. Riscaldare a 100-105°C evaporando a secchezza mediante (4.3). Si aggiunge al residuo secco qualche goccia di olio di oliva e si carbonizza cautamente alla fiamma o sotto essiccatore IR fino a che il prodotto cessa di rigonfiarsi. Si pone la capsula in muffola (4.4) portata alla temperatura di circa 525°C (porre attenzione a non superare questa temperatura per evitare la fusione delle ceneri) e si lascia fino a che il residuo della combustione sia diventato bianco. Raffreddare la capsula in essiccatore e pesare velocemente.

Se durante l'incenerimento la massa carboniosa non brucia completamente, le ceneri vanno riprese con acqua, evaporate di nuovo e incenerite nella muffola.

Per conserve contenenti cloruro sodico aggiunto è necessario riprendere il residuo della mineralizzazione con acqua, filtrare il liquido su filtro senza ceneri, bruciare il filtro ed il residuo carbonioso sino ad incenerimento completo, aggiungere la soluzione filtrata, evaporare ed incenerire di nuovo fino a peso costante.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il contenuto di ceneri è espresso per 100 g di prodotto.

14. - Determinazione dell'alcalinità delle ceneri

1. OGGETTO

Il metodo permette di determinare la quantità di acido necessaria a neutralizzare l'alcalinità delle ceneri fino a viraggio dell'indicatore specifico.

2. PRINCIPIO

Si determina per titrimetria con acido cloridrico, dopo aggiunta di acqua e riscaldamento, impiegando l'indicatore prescritto.

3. REATTIVI

3.1. Acido cloridrico soluzione 0,1 M

3.2. Sodio idrossido soluzione 0,1 M

3.3. Indicatore al metilarancio (0,05%): si disciolgono 0,5 g di metil arancio in acqua e si diluisce ad 1 litro.

5. MODO DI OPERARE

Si introduce una quantità misurata di HCl 0,1 M (3.1) nella capsula contenente le ceneri. Si riscalda a bagno maria evitando di portare a

secco. Si raffredda la soluzione, si aggiungono poche gocce di metilarancio (3.3) e si titola con NaOH 0,1 M (3.2).

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

L'alcalinità delle ceneri è data dal numero di ml di acido 0,1 M impiegati per neutralizzare le ceneri di 100 g di campione. Il numero di alcalinità è dato dal numero di ml di acido M impiegati per neutralizzare 1 g di ceneri.

15. - Determinazione dell'acidità totale

1. OGGETTO

Il metodo permette di determinare l'acidità titolabile con soluzione alcalina.

2. PRINCIPIO

Si determina per titolazione con sodio idrossido in presenza di fenolftaleina o per via potenziometrica.

3. REATTIVI

3.1. Sodio idrossido 0,1 M

3.2. Soluzione alcolica di fenolftaleina: 1% in alcol etilico a 95%.

4. APPARECCHIATURA (solo per 5.2)

4.1. pH-metro

4.2. Elettrodo a vetro

5. MODO DI OPERARE

5.1. Metodo all'indicatore

Una parte aliquota del campione se liquido, oppure, se solido, di soluzione da esso preparata, viene diluita con circa 250 ml di acqua precedentemente bollita.

Si titola con la soluzione alcalina (3.1) in presenza dell'indicatore (3.2), fino a colorazione rosa, persistente per 30 sec. Se il campione è fortemente colorato, per meglio apprezzare il viraggio, sarà opportuno eseguire ulteriori diluizioni o impiegare il metodo potenziometrico.

5.2. Metodo potenziometrico

Prima della determinazione tarare l'apparecchio (4.1) con le soluzioni tampone standard e lavare l'elettrodo (4.2) diverse volte con acqua. Si immerge quindi l'elettrodo e si inizia la titolazione agitando moderatamente. La soluzione alcalina (3.1) è aggiunta abbastanza rapidamente fino a pH 6 procedendo quindi più lentamente fino a pH 7.

Si procede quindi alla titolazione, aggiungendo quattro gocce alla volta fino a pH 8,1.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

L'acidità totale può essere espressa in ml di soluzione alcalina 0,1 M per 100 g o 100 ml oppure in meq per 1 o Kg di prodotto originale.

Molto spesso, nelle conserve vegetali, l'acidità totale viene anche espressa in grammi di acido citrico monoidrato per 100 g di prodotto ad eccezione delle conserve all'aceto e di quelle fermentate dove si esprime rispettivamente in grammi di acido acetico o di acido lattico per 100 g di liquido di governo o prodotto. Si applicano i seguenti fattori:

ml 1 di NaOH 0,1 M = g 0,007 di acido citrico monoidrato

ml 1 di NaOH 0,1 M = g 0,006 di acido acetico

ml 1 di NaOH 0,1 M = g 0,009 di acido lattico

16. - Determinazione dell'acidità volatile

1. OGGETTO

Il metodo descritto permette la determinazione degli acidi volatili che distillano in corrente di vapore.

2. PRINCIPIO

L'acidità volatile si determina per titolazione degli acidi separati per distillazione in corrente di vapore.

3. REATTIVI

3.1. Sodio idrossido 0,1 M

3.2. Soluzione alcolica di fenoftaleina: 1% in alcol etilico a 95%.

4. APPARECCHIATURA

Apparecchio di distillazione composto da un generatore di vapor d'acqua, da un gorgogliatore nel quale è posta la sostanza da analizzare, da un raccordo e da un refrigerante.
E' opportuno usare un apparecchio del tipo illustrato nella fig. 1.
La parte inferiore della camicia interna del distillatore deve avere una capacità di circa 150 ml.

5. MODO DI OPERARE

Alimentare il generatore di vapore con acqua distillata, bollita per qualche minuto allo scopo di eliminare l'anidride carbonica disciolta. Porre nel gorgogliatore il prodotto opportunamente preparato. Raccogliere circa 150 ml distillati in 30 min e titolare l'acidità con la soluzione alcalina (3.1) in presenza di indicatore (3.2).

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

L'acidità volatile si esprime in grammi di ac. acetico per 100 g di prodotto, 1 ml NaOH 0,1 M = 0,006 g di acido acetico.
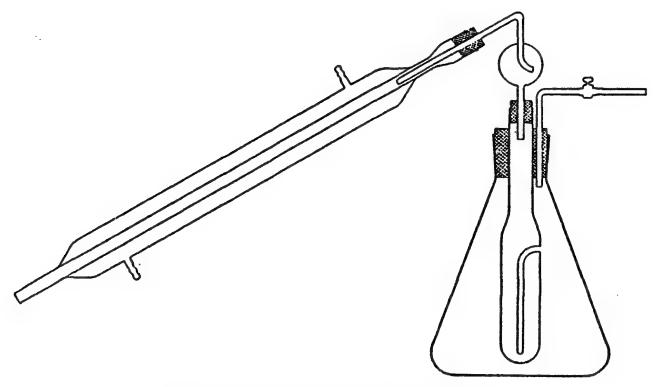
Figura 1. - Apparecchio per la distillazione in corrente di vapore.

17. - Determinazione del pH (concentrazione idrogenionica)

1. OGGETTO

Il metodo permette di determinare il logaritmo decimale dell'inverso della concentrazione idrogenionica o pH.

2. PRINCIPIO

Si determina misurando la differenza di potenziale tra una coppia di elettrodi immersi nel liquido in esame di cui uno con potenziale fisso e noto.

3. REATTIVI

3.1. Soluzione tampone a pH 3,00

3.2. Soluzione tampone a pH 7,00

3.3. Soluzione satura di potassio cloruro

4. APPARECCHIATURA

4.1. pH-metro

4.2. Elettrodi

5. MODO DI OPERARE

Effettuare l'azzeramento dello strumento (4.1) seguendo le indicazioni allegate all'apparecchio utilizzato. Immergere gli elettrodi o l'elettrodo combinato (4.2) nella soluzione tampone (3.1) e tarare

l'apparecchio tenendo conto della temperatura. Togliere la soluzione tampone, lavare accuratamente gli elettrodi con acqua.

Ripetere l'operazione con la soluzione tampone (3.2). Dopo aver nuovamente pulito gli elettrodi eseguire la misurazione sul campione.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il valore di pH viene espresso alla prima cifra decimale.

18. - Determinazione degli zuccheri

1. OGGETTO

I metodi sotto descritti permettono la determinazione degli zuccheri riduttori e del saccarosio da soli o in miscela tra di loro.

A. Dosaggio degli zuccheri riduttori
(per tenori in zuccheri inferiori al 5%).

2. PRINCIPIO (metodo di Luff-Schoorl)

La soluzione zuccherina viene portata all'ebollizione, in condizioni standard, in presenza di una soluzione di rame rameico che viene ridotto a rameoso. L'eccesso di rame rameico viene titolato per iodometria.

3. REATTIVI

3.1. Soluzione di Carrez I: sciogliere in acqua 4 g di zinco acetato biidrato e 3 g di acido acetico glaciale portando a 100 ml con acqua.

3.2. Soluzione di Carrez II: sciogliere in acqua 10,6 g di potassio ferrocianuro portando a 100 ml con acqua.

3.3. Reattivo di Luff-Schoorl

Soluzione "A": 25 g di rame solfato(ico) pentaidrato, esente da ferro, in 100 ml di acqua.

Soluzione "B": 50 g di acido citrico monoidrato in 50 ml di acqua.

Soluzione "C": 143,8 g di sodio carbonato anidro in 300 ml di acqua, sciogliere a caldo e raffreddare.

Aggiungere, agitando lentamente, la soluzione "B" alla soluzione "C" fino a scomparsa dello sviluppo gassoso e successivamente la soluzione "A" portando al volume di 1000 ml con acqua. Lasciare riposare una notte e poi filtrare e controllare il reattivo così ottenuto.

3.3.1. Controllo del reattivo di Luff-Schoorl

3.3.1.1 Aggiungere a 25 ml di reattivo 10 ml di soluzione di potassio ioduro (3.7) e 25 di acido solforico 3 M (3.6), titolare con sodio tiosolfato 0,1 M (3.4) in presenza di salda d'amido (3.5) che si aggiunge verso la fine della titolazione. La quantità utilizzata

di sodio tiosolfato 0,1 M deve essere di 25 ml.

3.3.1.2. Versare 10 ml di reattivo in un matraccio tarato da 100 ml e portare a volume con acqua.

3.3.1.3. Mescolare in un matraccio 10 ml di reattivo diluito (3.3.1.2) con 25 ml di acido cloridrico 0,1 M (3.11) e riscaldare per 1 h in bagno d'acqua bollente. Raffreddare, riportare al volume iniziale e titolare con sodio idrossido 0,1 M (3.10) in presenza di fenolftaleina. La quantità di sodio idrossìdo utilizzata deve essere compresa tra 5,5 e 6,5 ml.

3.3.1.4. Titolare con acido cloridrico 0,1 M, in presenza di fenolftaleina, 10 ml di reattivo diluito (3.3.1.2). La quantità di acido cloridrico 0,1 M utilizzata deve essere compresa tra 6 e 7 ml.

3.3.1.5. Il reattivo deve avere un pH compreso tra 9,3 e 9,4 a 20°C.

3.4. Soluzione di sodio tiosolfato 0,1 M.

3.5. Salda d'amido: stemperare 5 g di amido solubile in 50 ml di acqua e portare ad 1 l con acqua bollente, far bollire per 3 min, lasciare raffreddare ed aggiungere, eventualmente, 10 g di mercurio ioduro come stabilizzante.

3.6. Acido solforico 3 M

3.7. Soluzione di potassio ioduro 30% (m/v)

3.8. Granelli di pietra pomice bolliti in acido cloridrico, lavati con acqua ed essiccati.

3.9. Iso-pentanolo

3.10. Sodio idrossido 0,1 M

3.11. Acido cloridrico 0,1 M

3.12. Soluzione di fenolftaleina 1% (m/v) in alcol etilico 95%.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Matraccio a fondo piatto della capacità di 300 ml con collo a smeriglio munito di refrigerante a riflusso.

4.2. Omogeneizzatore

4.3. Rete metallica provvista di uno schermo di amianto munito di un foro corrispondente al diametro del fondo del matraccio.

4.4. Bilancia tecnica.

5. MODO DI OPERARE

Pesare 10 g di campione precedentemente omogeneizzato o una quantità precisata nella parte speciale, su bilancia tecnica (4.4), riprenderli con acqua e versarli in matraccio tarato da 200 ml fino a portare il volume a circa 150 ml. Aggiungere dopo qualche ora di riposo, per permettere la solubilizzazione degli zuccheri, 5 ml della

soluzione di Carrez I (3.1) e 5 ml della soluzione dì Carrez II (3.2), agitando dopo ogni aggiunta. Portare a volume e filtrare su filtro a pieghe. Il filtrato dovrà essere diluito, prendendo nota della diluizione, in modo che 25 ml della soluzione finale contengano una quantità di zucchero riduttore compresa tra 15 e 60 mg; nel caso di presenza di lattosio la quantità limite sarà 85 mg. Prelevare quindi con una pipetta tarata 25 ml di reattivo, preparato e controllato come in (3.3) e versare nel matraccio (4.1) aggiungendo poi 25 ml della soluzione zuccherina finale diluita, esattamente misurati con buretta. Aggiungere 2 granelli di pietra pomice (3.8) inserire il refrigerante (4.1), mettere il matraccio sulla rete metallica (4.3) e portare il liquido all'ebollizione entro 2 min ca. A partire da questo momento far bollire cautamente per 10 min esatti. Raffreddare subito in acqua fredda e dopo circa 5 min operare come segue: aggiungere 10 ml della soluzione di potassio ioduro (3.7) e subito dopo e con cautela, per evitare la formazione di schiuma, 25 ml di acido solforico 3 M (3.6). Titolare quindi con sodio tiosolfato 0,1 M (3.4) fino a comparsa di un colore giallo smorto, aggiungere 5 ml di salda d'amido (3.5) e completare la titolazione fino a scomparsa della colorazione blu. Effettuare un saggio in bianco sostituendo i 25 ml di soluzione zuccherina con 25 ml di acqua. Dai ml di tiosolfato 0,1 M consumati nella prova in bianco vanno detratti i ml di tiosolfato impiegati nella determi-

nazione. Il numero corretto di ml di tiosolfato 0,1 M viene indicato con la lettera (a).

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Con l'aiuto della tabella allegata si stabiliscono i mg dello zucchero riduttore, presenti in 25 ml di soluzione zuccherina, corrispondenti ad (a).
Tenendo conto delle diluizioni effettuate si calcola il tenore percentuale di zucchero riduttore presente nel campione.

7. OSSERVAZIONE

Prima dell'acidificazione con acido solforico 3 M può essere utile aggiungere 1 ml circa di iso-pentanolo (3.9) onde evitare la formazione di schiuma.

B. DOSAGGIO DEGLI ZUCCHERI RIDUTTORI
(per tenori in zucchero superiori al 5%)

2. PRINCIPIO (metodo volumetrico Fehling)

La soluzione zuccherina viene titolata con un volume noto di una soluzione standard di rame rameico (liquido di Fehling), portata all'ebollizione, fino a riduzione totale in presenza di blu di metilene come indicatore. Il blu di metilene ha infatti la proprietà di decolorarsi a caldo in presenza di uno zucchero riduttore, in soluzione alcalina.

Tabella per 25 ml del reattivo di Luff-Schoorl

ml di 0,1 M $Na_2S_2O_3$ a 2 minuti di riscaldamento, 10 minuti di ebollizione

0,1 M $Na_2S_2O_3$	Glucosio, fruttosio zuccheri invertiti $C_6H_{12}O_6$		Lattosio $C_{12}H_{22}O_{11}$		Maltosio $C_{12}H_{22}O_{11}$		0,1 M $Na_2S_2O_3$
ml	mg	differenza	mg	differenza	mg	differenza	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2	3,1	88,0		94,6		23

3. REATTIVI

3.1. Soluzione defecante: soluzione satura di piombo acetato neutro

3.2. Sodio ossalato o potassio ossalato

3.3. Liquido di Fehling:

Fehling "A": sciogliere in acqua 69,278 g di rame solfato (ico) pentaidrato e portare a volume di 1000 ml.

Fehling "B": sciogliere 346 g di sale di Seignette (sodio e potassio tartrato) e 100 g di sodio idrossido. Portare a 1000 ml. Le due soluzioni si conservano in bottiglie di vetro chiuse.

3.4. Soluzione di blu di metilene all'1% (m/v). Controllare la concentrazione della soluzione con una soluzione all'1% (m/v) di glucosio solido anidro; 2 gocce di blu di metilene devono essere decolorate da 0,1 ml di tale soluzione.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Matraccio a fondo piatto della capacità di 300 ml

4.2. Bagno ad acqua termoregolato

4.3. Omogeneizzatore

4.4. Bilancia tecnica

5. MODO DI OPERARE

Pesare 20 g di campione precedentemente omogeneizzato, o una quantità precisata nella parte speciale, su bilancia tecnica (4.4), riprendere con acqua e versarli in matraccio tarato da 200 ml. Lavare con acqua fino a portare il volume a ca. 150 ml. Dopo un certo tempo di riposo per permettere la solubilizzazione degli zuccheri, aggiungere mediante pipetta tarata 10 ml della soluzione defecante (3.1) e, dopo 15 min., eliminare l'eccesso di piombo con l'aggiunta della quantità minima necessaria di sodio ossalato o di potassio ossalato (3.2), agitando dopo ogni aggiunta. Portare a volume, agitare e filtrare. Diluire il filtrato, prendendo nota delle diluizioni, in modo che la concentrazione zuccherina finale, in zuccheri riduttori, della soluzione sia circa dell'1%. Versare in un matraccio a fondo piatto da 300 ml 5 ml di Fehling "A" (3.3), 5 ml di Fehling "B" (3.3), 40 ml di acqua ed alcune palline di vetro o granelli di pomice. Scaldare fino ad incipiente ebollizione ed aggiungere, mediante buretta, un volume della soluzione zuccherina finale diluita, di poco inferiore a quello necessario per la completa decolorazione del liquido di Fehling (*); a questo punto continuare l'ebollizione della soluzione per il numero di minuti prescritti per ciascuno zucchero (3 min per glucosio, fruttosio e zucchero invertito; 4 min per il maltosio e 6

(*) Per individuare questa quantità occorre eseguire una prova orientativa preliminare.

min per il lattosio) previa aggiunta di due gocce di blu di metilene (3.4) e, sempre con il liquido in ebollizione, far cadere entro l'ultimo min dei tempi sopra citati, goccia a goccia, altra soluzione zuccherina fino a scomparsa della colorazione azzurra dell'indicatore.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

$$\% \text{ di zucchero riduttore } \frac{f \times d}{a - 0{,}1}$$

dove:

f = fattore dovuto al potere riducente dello zucchero determinato

glucosio = 4,945

fruttosio = 5,350

invertito = 5,150

lattosio = 6,760

d = diluizione della soluzione zuccherina

a = numero di ml della soluzione zuccherina impiegati nella titolazione

0,1 = ml impiegati dal blu di metilene

C. DOSAGGIO DEL SACCAROSIO
(in presenza di zuccheri riduttori)

2. PRINCIPIO

Il tenore in saccarosio viene calcolato determinando gli zuccheri riduttori prima e dopo inversione acida o per via chimica volumetrica o per via polarimetrica applicando la formula di Clerget.

C_1. METODO VOLUMETRICO FEHLING

3. REATTIVI

3.1. Tutti quelli previsti in (B.3)

3.2. Soluzione alcolica di fenolftaleina 1% (m/v)

3.3. Soluzione di acido cloridrico $d_{20} = 1,10$

3.4. Soluzione di acido acetico 1:1 (v:v)

3.5. Soluzione di sodio idrossido 30% (m/v) ca.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Tutta quella prevista in (B.4)

4.2. Bagno ad acqua termostatato

5. MODO DI OPERARE

Prelevare con pipetta 50 ml di soluzione preparata per il dosaggio degli zuccheri come in (A) o (B), secondo il caso, e introdurli in

matraccio tarato da 100 ml. Addizionare 5 ml di acido cloridrico (3.3). Immergere il matraccio per 15 min nel bagno ad acqua (4.2) termostatato a 70°C. Raffreddare rapidamente ed aggiungere alcune gocce di fenolftaleina (3.2). Con poche gocce di soluzione di sodio idrossido (3.5) portare fino a debole colorazione rosa e subito decolorare la soluzione con la minima quantità di acido acetico diluito (3.4). Portare a volume con acqua e procedere come descritto in B.5.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

% di saccarosio = (A-a)x0,95

dove:

A = tenore percentuale degli zuccheri riduttori dopo inversione

a = tenore percentuale degli zuccheri riduttori prima dell'inversione

C_2. METODO POLARIMETRICO

3. REATTIVI

3.1. Soluzione defecante: soluzione satura di piombo acetato neutro

3.2. Spiombante: sodio ossalato o potassio ossalato anidro

3.3. Soluzione di acido cloridrico al 32% circa (d_{20}=1,14)

3.4. Soluzione all'1% (m/v) di fenolftaleina in alcol etilico 95%

3.5. Soluzione di acido acetico 1:1 (v/v)

3.6. Soluzione di sodio idrossido al 30% (m/v)

4. APPARECCHIATURA

4.1. Saccarimetro o polarimetro con sorgente luminosa costituita da una lampada a vapori di sodio. L'apparecchio deve essere installato in un locale la cui temperatura sia prossima a 20°C.

4.2. Tubi polarimetrici della lunghezza di 200 mm ±0,03

4.3. Bagno ad acqua termostatabile

4.4. Bilancia tecnica

5. MODO DI OPERARE

Pesare 20 g di campione precedentemente omogeneizzato, o una quantità precisata nella parte speciale, su bilancia tecnica (4.4), riprendere con acqua, versarli in matraccio tarato da 200 ml e lavare con acqua fino a portare il volume a 150 ml ca. Dopo qualche ora di riposo, per consentire la solubilizzazione completa degli zuccheri, aggiungere mediante pipetta tarata 10 ml di soluzione defecante (3.1) e, dopo 15 min eliminare l'eccesso di piombo con l'aggiunta della quantità minima necessaria di sodio ossalato o di potassio ossalato (3.2).
Portare a volume, agitare, lasciare in riposo per 30 min e filtrare su filtro a pieghe (soluzione "A").

Prelevare 50 ml della soluzione "A", introdurli in matraccio tarato da 100 ml ed addizionare 5 ml di acido cloridrico (3.3). Immergere il matraccio per 15 min nel bagno ad acqua termostatato (4.3) a 70°C e dopo raffreddare rapidamente. Aggiungere alla soluzione fredda in presenza di fenolftaleina (3.4) alcune gocce di sodio idrossido (3.6) fino a debole colorazione rossa decolorando infine con la minima quantità di soluzione di acido acetico (3.5). Portare a volume con acqua (sol."B"). Riempire due tubi polarimetrici (4.2) rispettivamente con la soluzione "A" e con la soluzione "B" ed effettuare le letture delle polarizzazioni, prendendo nota della temperatura.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

6.1. Per polarimetro con scala in gradi cerchio si applica la seguente formula di Clerget:

$$\% \text{ saccarosio} = \frac{75.19\ (P-P_1)}{142,66-0,5t}$$

dove:

P = polarizzazione prima dell'inversione riferita a 100 g di sostanza

P_1 = polarizzazione dopo l'inversione riferita a 100 g di sostanza

t = temperatura, in gradi centigradi, delle soluzioni al momento della lettura polarimetrica

D. DOSAGGIO DEL LATTOSIO IN PRESENZA DI ALTRI ZUCCHERI RIDUTTORI

2. PRINCIPIO (metodo microbiologico)

La soluzione zuccherina viene sottoposta a fermentazione con Saccharomyces Cerevisiae del lievito di birra che lascia intatto il lattosio, mentre distrugge tutti gli altri zuccheri riduttori. Dopo chiarificazione e filtrazione della soluzione, il lattosio viene determinato con il metodo Luff-Schoorl (metodo A), gli altri zuccheri riduttori vengono determinati, assieme al lattosio, con il metodo (A); per differenza tra le due determinazioni si risale alla quantità degli altri zuccheri riduttori.

3. REATTIVI

Tutti i reattivi previsti al punto (A) con la stessa numerazione da (3.1) a (3.11).

3.12. Sospensione di Saccharomyces Cerevisiae: 25 g di lievito di birra fresco si stemperano in 100 ml di acqua. La sospensione si conserva in frigorifero per una settimana al massimo.

4. APPARECCHIATURA

Tutte le apparecchiature previste al punto 5 del metodo (A) con la stessa numerazione da (4.1) ad (4.4).

4.5. Stufa termostatata a 38°-40°C.

5. MODO DI OPERARE

5.1. Determinazione del lattosio

Pesare 20 g del prodotto precedentemente omogeneizzato, o la quantità precisata nella parte speciale, su bilancia tecnica (4.4), riprendere con acqua e versarli in un matraccio tarato da 200 ml, diluendo a circa 150 ml, lasciare a riposo per qualche ora e poi portare a volume con acqua. Prelevare 50 ml della soluzione zuccherina in matraccio tarato da 200 ml e portare a volume con acqua. Tale soluzione costituisce la soluzione madre "M" che opportunamente diluita deve essere utilizzata sia per il dosaggio del lattosio, sia per quello degli altri zuccheri (glucosio, zucchero invertito, fruttosio). Introdurre 50 ml della soluzione "M" in matraccio da 200 ml, addizionare 5 ml della sospensione di lievito (3.12) mescolando bene e porre il tutto per 2 h alla temperatura di 39°-40°C nella stufa (4.5). Raffreddare la soluzione a 20°C, aggiungere 5 ml di Carrez I (3.1) e 5 ml di Carrez II (3.2), agitare dopo ogni aggiunta, portare a volume di 200 ml, agitare nuovamente e filtrare con imbuto di vetro su filtro a pieghe. Effettuare la determinazione del lattosio su 25 ml della soluzione zuccherina filtrata e diluita (contenuto in lattosio compreso fra 10 e 85 mg) procedendo da questo momento secondo il metodo (1), effettuando ugualmente la prova in bianco e indicando con L_1 la differenza tra i ml della prova in

bianco ed i ml di tiosolfato utilizzati per la determinazione del lattosio.

5.2. Determinazione degli altri zuccheri

Effettuare la determinazione degli zuccheri riduttori totali secondo il metodo (A) a partire da 50 ml della soluzione 'M' ottenuta come descritto (5.1) e con la stessa diluizione effettuata per la determinazione del lattosio; eseguire regolarmente la prova in bianco ed indicare con L_t la differenza tra i ml della prova in bianco ed i ml di tiosolfato utilizzati per la determinazione degli zuccheri riduttori.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

$$L_t = L_1 + L_2$$

dove

L_t = ml relativi agli zuccheri riducenti totali

L_1 = ml relativi al lattosio

L_2 = ml relativi agli zuccheri riducenti diversi dal lattosio

Con l'aiuto della tabella allegata si stabiliscono i mg di lattosio corrispondenti a L_1 e i mg degli altri zuccheri riduttori corrispondenti a L_2 presenti in 25 ml della soluzione zuccherina diluita.

Tenendo conto della diluizione effettuata si calcola il tenore percentuale degli zuccheri riduttori presenti nel campione.

E. DETERMINAZIONE DEI MONO E DISACCARIDI MEDIANTE HPLC

2. PRINCIPIO

La determinazione contemporanea dei mono e disaccaridi viene eseguita mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC).

3. REATTIVI

3.1. Fase mobile, acetonitrile per HPLC: acqua (80:20) v:v

I costituenti debbono essere filtrati sotto vuoto separatamente (4.2) (l'acqua con filtro di cellulosa, l'acetonitrile con filtro di teflon) e successivamente miscelati. Con la filtrazione sotto vuoto si ottiene anche il degasaggio dell'eluente.

3.2. Soluzione acquosa standard contenente 0,5% di ciascuno zucchero.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Cromatografo liquido ad alta pressione costituito da:

- pompa a pressione regolabile
- valvola d'iniezione a loop
- registratore con eventuale sistema di integrazione
- rivelatore ad indice di rifrazione
- colonna cromatografica ad alta risoluzione, impaccata con fase legata NH_2, specifica per carboidrati o similare con granulometria 10 µm

4.2. Sistema sotto vuoto per filtrazione dell'eluente costituito da:

- Pompa da vuoto a caduta d'acqua
- matraccio per filtrazione sotto vuoto a smerigliatura normalizzata
- imbuto con gambo a smerigliatura normalizzata a setto poroso
- filtri in cellulosa con porosità 0,45 µm
- filtri in teflon con porosità 0,45 µm

4.3. Siringa per microfiltrazione dei campioni con setti filtranti intercambiabili, porosità 0,45 µm

5. MODO DI OPERARE

5-10 g di campione, se solido preventivamente omogeneizzato in acqua così da portare in soluzione tutti gli zuccheri, sono successivamente diluiti sino ad ottenere un contenuto di ogni singolo zucchero compreso tra 0,25 e 1%. La soluzione così ottenuta viene filtrata prima con filtro a pieghe e successivamente mediante l'apposita siringa (4.3). Iniettare 10 µl del filtrato nel cromatografo regolato con flusso dell'eluente di circa 2 ml/min.
Alle stesse condizioni operative si iniettano 10 µl delle soluzioni standard. I singoli zuccheri sono identificati dal loro tempo di ritenzione secondo la sequenza: fruttosio - glucosio - saccarosio - maltosio - lattosio.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La concentrazione per ogni singolo zucchero si ricava dal rapporto tra le aree dei picchi dello standard e quelle del campione applicando la formula

$$Cc = \frac{Ac \cdot Cst \cdot d}{Ast}$$

dove:

Cc = concentrazione dello zucchero nel campione in %

Ac = area relativa allo zucchero nel cromatogramma del campione

Cst= concentrazione dello standard in %

d = diluizione del campione

Ast= area del picco relativo allo zucchero nel cromatogramma dello standard

19. - Ricerca della saccarina

1. OGGETTO

Il metodo permette la ricerca e l'identificazione della saccarina eventualmente aggiunta.

2. PRINCIPIO

Estrazione della saccarina con etere etilico dal prodotto previamente acidificato e suo riconoscimento mediante saggi organolettici (A) o mediante trasformazione in acido salicilico (B).

3. REATTIVI

3.1. Acido cloridrico 2M

3.2. Etere etilico

3.3. Acido solforico (d_{20}=1,84) 1:3 v/v

3.4. Soluzione di potassio permanganato al 5%

3.5. Acido cloridrico al 37% (d_{20}=1,19)

3.6. Sodio idrossido in gocce

3.7. Soluzione di ferro cloruro (ico) 0,5%

4. APPARECCHIATURA

4.1. Capsula di platino

4.2. Stufa a secco regolata a 210-215°C

4.3. Imbuti separatori da 500 ml

Se il prodotto è liquido, se ne acidificano 50 ml con acido cloridrico (3.1); se il prodotto è solido o semisolido, se ne acidifica l'estratto acquoso ottenuto da 50-100 g di prodotto. Si estrae 3 volte in imbuto separatore (4.3) con porzioni di 25 ml di etere (3.2).Si lavano gli estratti eterei riuniti con 5 ml di acqua, si trasferisce l'estratto etereo in una capsula (4.1) e si lascia evaporare all'aria.

A. SAGGIO ORGANOLETTICO

Si assaggia il residuo dell'evaporazione. La presenza di 20 mg di saccarina per litro o per chilogrammo di prodotto può essere svelata dal sapore dolce del residuo.

B. TRASFORMAZIONE IN ACIDO SALICILICO

Il residuo all'evaporazione viene disciolto in poca acqua calda (circa 10 ml) si aggiungono 2 ml di acido solforico (3.3); si riscalda all'ebollizione e si aggiunge goccia a goccia un leggero eccesso di soluzione potassio permanganato (3.4). Si raffredda la soluzione e vi si scioglie circa 1 g di sodio idrossido (3.6); si filtra in una capsula (4.1). Si evapora a secchezza e si scalda per 20 min a 210-215°C (4.2); si scioglie il residuo in acqua, si acidifica con acido cloridrico (3.5) e si saggia la presenza di acido salicilico aggiungendo una goccia di soluzione di ferro cloruro (3.7). La formazione di acido salicilico è rivelata da una colorazione violetta. Con questo procedimento l'acido salicilico, eventualmente presente viene distrutto, mentre si possono svelare con certezza 5 mg/l di saccarina.

20. - Determinazione della saccarina

1. OGGETTO

Il metodo consente il dosaggio della saccarina.

2. PRINCIPIO

La saccarina viene determinata come solfato di bario previa fusione alcalina ed ossidazione con acqua di bromo.

3. REATTIVI

3.1. Acido acetico glaciale

3.2. Acido fosforico 85% (d_{20}=1,70)

3.3. Etere etilico

3.4. Sodio carbonato, soluzione al 10%

3.5. Potassio carbonato polvere

3.6. Acqua di bromo

3.7. Bario cloruro, soluzione al 10%

3.8. Piombo acetato neutro, soluzione al 20%

3.9. Sodio carbonato in polvere

3.10. Acido cloridrico (d_{20}=1,19) diluito 1:2 (v/v)

4. APPARECCHIATURA

4.1. Imbuti separatori da 500 ml

4.2. Bagno maria

4.3. Capsule di platino

4.4. Crogiuolo di platino

5. MODO DI OPERARE

5.1. Preparazione del campione

5.1.1. Sciroppi e succhi di frutta.

Si portano 100-150 g di prodotto in matraccio tarato da 250 ml con poca acqua, si diluisce fino a circa 200 ml, si aggiungono 5 ml di acido acetico (3.1) e si agita, quindi si tratta con 5 ml di soluzione di piombo acetato neutro (3.8) e si agita di nuovo. Si porta a volume, si agita e si filtra.

5.1.2. Prodotti solidi o semisolidi.

Si portano 50-75 g di prodotto con poca acqua in un matraccio tarato da 250 ml, si aggiunge acqua bollente fino a ca. 200 ml. Si lascia riposare 2 h agitando di tanto in tanto, si aggiungono 5 ml di acido acetico (3.1), si agita, quindi si aggiunge un leggero eccesso di soluzione di piombo acetato neutro (3.8), si lascia a riposo per 20 min, si porta a volume, si agita e si filtra.

5.2. Determinazione

150 ml di filtrato ottenuto come in (5.1) sono posti in un imbuto separatore ed acidificati con acido fosforico (3.2). Si estrae tre volte con porzioni di 80 ml di etere etilico (3.3) agitando ogni volta per 2 min. Gli estratti eterei vengono riuniti e lavati con 5 ml di acqua. Si elimina l'etere per distillazione e si trasferisce il residuo in un crogiuolo di platino (4.4), aiutandosi con poco etere ed eventualmente con poca acqua. Si evapora l'etere su b.m.(4.2) e si aggiungono al residuo 2-3 ml di soluzione di sodio carbonato al 10% (3.4), in modo che tutta la saccarina sia in contatto con la soluzione e si evapora nuovamente su b.m. (4.2).

Al residuo secco nel crogiuolo (4.4) sono aggiunti 4 g di una miscela in parti uguali di sodio carbonato (3.9) e potassio carbonato (3.5). Si scalda cautamente fino a fusione entro 30 min. Si lascia raffreddare la massa fusa, si scioglie con acqua e si aggiungono 5 ml di acqua di bromo (3.6). Si acidifica con acido cloridrico (3.10) e si filtra, lavando il filtro con poca acqua e portando a 200 ml ca. Si scalda all'ebollizione e si aggiunge lentamente un eccesso di soluzione di bario cloruro (3.7).Il precipitato, lasciato depositare per una notte, viene lavato, filtrato, essiccato e calcinato in crogiuolo (4.4) previamente tarato.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La quantità di saccarina si ottiene moltiplicando il peso del bario solfato, corretto della prova in bianco dei reattivi, per il fattore 0,7844.

21. - Determinazione dei ciclammati

1. OGGETTO

Il metodo consente l'identificazione dei ciclammati in assenza di anidride solforosa.

2. PRINCIPIO

Formazione in ambiente acido di un precipitato bianco di bario solfato per aggiunta di sodio nitrito.

3. REATTIVI

3.1. Bario cloruro

3.2. Acido cloridrico conc. (d=1,19)

3.3. Sodio nitrito

5. MODO DI OPERARE

Aggiungere 2 g di bario cloruro (3.1) a 100 ml di campione o di estratto acquoso; lasciare riposare per 5 min e filtrare. Acidificare

con 10 ml di acido cloridrico (3.2) ed aggiungere 0,2 di sodio nitrito (3.3); la comparsa di un precipitato bianco di bario solfato indica la presenza di ciclammato (cicloesilsolfammato).

22. - Determinazione dei ciclammati di sodio e di calcio

1. OGGETTO

Il metodo consente il dosaggio dei ciclammati di sodio e di calcio.

2. PRINCIPIO

Sotto pressione ed in ambiente acido il ciclammato viene idrolizzato a cicloesilammina, che ,estratta con cloroformio,viene fatta reagire con p-chinone etanolico formando un prodotto colorato: il 2-(cicloesilammino)-1,4-benzochinone.

3..REATTIVI

3.1. Sodio ciclammato e calcio ciclammato essiccato in stufa a 100°C per 4 h

3.2. Soluzione per sviluppo del colore (da preparare al momento dell'uso): 0,30 g di p-chinone in 100 ml di alcol etilico assoluto

3.3. Cloroformio

3.4. Acido cloridrico conc. (d_{20}=1,19)

4. APPARECCHIATURA

4.1. Autoclave capace di funzionare a 2 atm assolute (121°C)

4.2. Omogeneizzatore funzionante a circa 18.500 giri al min

4.3. Miscelatore ad alta velocità

5. MODO DI OPERARE

Introdurre 100 g del campione nell'omogeneizzatore (4.2) ed omogeneizzare per 2-3 min. Pesare esattamente una quantità di omogeneizzato, con un presunto contenuto di 15-30 mg di ciclammato, in un bicchiere da 100 ml; in altro bicchiere da 100 ml pesare accuratamente lo standard contenente una quantita di ciclammato circa equivalente a quella presunta del campione. Diluire campione e standard a circa 40 ml con acqua, aggiungere 13 ml di acido cloridrico (3.4) e diluire ancora fino a circa 60 ml con acqua; porre ciascun bicchiere in un altro da 400 ml coperto con vetrino d'orologio e mettere in autoclave per sette-otto h a 2 atm ass. (121°C).

Trasferire quantitativamente il campione e lo standard raffreddati (aiutandosi con acqua) in provette da centrifuga da 250 ml e centrifugare a 1800 giri al min; filtrare i surnatanti su lana di vetro e raccogliere i filtrati in matraccio tarato da 250 ml. Lavare due volte per centrifugazione i residui con 40 ml di acqua

raccogliendo i surnatanti nei matracci e portare a volume.

Pipettare 25 ml di ciascuna soluzione (campione e standard) in imbuti separatori da 150 ml e portare a pH = 12 con sodio idrossido 10 M (bastano 12 gocce, ma è consigliabile aggiungere 3-4 gocce in eccesso). Aggiungere a ciascun imbuto separatore 25 ml di cloroformio (3.3), agitare energicamente e trasferire 20 ml dell'estratto cloroformico in un matraccio tarato da 50 ml; aggiungere 10 ml della soluzione etanolica di p-chinone (3.2).

In modo analogo preparare il bianco.

Mettere su b.m. a 60°C per due ore al riparo della luce le tre soluzioni (campione, standard e bianco). Raffreddare, portare a volume con cloroformio e leggere l'assorbanza a 493 nm contro il bianco.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

$$\% \text{ Sodio ciclammato} = \frac{A \cdot P'}{A' \; P \; 10}$$

A = assorbanza campione

A'= " standard

P'= peso standard in mg

P = peso campione in g

N.B. Per convertire in calcio ciclammato anidro moltiplicare per 0,995.

23. - Determinazione dell'aspartame mediante HPLC

1. OGGETTO

Il metodo descritto consente la determinazione del dolcificante artificiale "aspartame" (estere metilico del L-aspartil-L-fenil-alanina).

2. PRINCIPIO

Separazione e determinazione per HPLC dell'aspartame.

3. REATTIVI

3.1. Fase mobile: Soluzione 0,1 M di acido citrico e 0,5 M di sodio perclorato.

Sciogliere 32,1 g di sodio perclorato e 10,5 g di acido citrico monoidrato in 300 ml di acqua in matraccio tarato da 500 ml. Portare a volume e mescolare. Trasferire la soluzione in un matraccio da vuoto da 1000 ml con sbarretta magnetica e porre su agitatore magnetico. Aggiungere sodio idrossido al 50% fino a pH = 4,7. Tappare il matraccio da vuoto, collegare con la pompa (4.2) e degasare l'eluente per aspirazione sotto agitazione per 5 min. Filtrare la soluzione su carta Whatman 1 a pressione ridotta.

3.2. Soluzione standard di aspartame 2 mg/ml.

La soluzione va preparata quotidianamente.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Cromatografo liquido ad alta pressione, costituito da:

- pompa a pressione regolabile
- valvola di iniezione a loop
- colonna cromatografica ad alta risoluzione in acciaio: 1 m x 2,1 mm, impaccata con silice legata a scambiatore cationico forte SCX, granulometria 10 µm
- rivelatore spettrofotometrico a 254 nm
- registratore con eventuale sistema di integrazione

4.2. Sistema sotto vuoto per filtrazione della fase mobile costituito da:

- pompa da vuoto ad acqua
- matraccio per filtrazione sotto vuoto a smerigliatura normalizzata
- imbuto con gambo a smerigliatura normalizzata e setto poroso
- filtri in cellulosa con porosità 0,45 µm.

4.3. Siringa per microfiltrazione dei campioni con filtri di cellulosa, porosità 0,45 µm intercambiabili.

5. MODO DI OPERARE

5.1. Preparazione del campione.

Prodotti liquidi o solubili in acqua: prelevare un campione e diluire in modo da ottenere una concentrazione presunta di aspartame fra 0,05 e 2 mg/ml.

Filtrare con siringa (4.3).

Prodotti parzialmente solubili in acqua: Trattare ripetutamente il campione con metanolo, filtrando dopo ogni estrazione. Evaporare a temperatura ambiente in corrente d'azoto la soluzione metanolica, e disciogliere il residuo nella quantità d'acqua necessaria ad ottenere una concentrazione d'aspartame entro il campo di sensibilità.

5.2. Analisi cromatografica. Regolare la pompa del cromatografo (4.1) a un flusso di 0,5 ml/min e operare a temperatura ambiente. Iniettare 25 µl di campione per mezzo della siringa (4.3) e lavare successivamente la valvola di iniezione con 2-3 ml di acqua fra un'iniezione e l'altra.

L'aspartame in questa condizione viene rivelato a 254 nm ed ha un tempo di ritenzione di circa 7 min.

5.3. Curva di taratura. Nelle stesse condizioni operative si iniettano soluzioni standard di aspartame fra 0,05 e 2 mg/ml.

Si costruisce una curva di taratura mettendo in ascisse le concentrazioni ed in ordinate le aree dei picchi.

La curva è rettilinea nell'intervallo di concentrazioni utilizzate.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La concentrazione dell'aspartame si ricava dal rapporto tra l'area del picco dello standard e quella del campione applicando la formula

$$Cc = \frac{Ac \cdot Cst \cdot d}{Ast}$$

dove:

Cc = concentrazione dell'aspartame nel campione in mg/ml

Ac = area relativa all'aspartame nel cromatogramma del campione

Cst= concentrazione dello standard in mg/ml

d = diluizione del campione

Ast= area del picco relativo all'aspartame nel cromatogramma dello standard

24. - Determinazione della presenza di coloranti artificiali

1. OGGETTO

Il metodo permette la ricerca di coloranti artificiali.

2. PRINCIPIO

I coloranti artificiali vengono fissati su lana, solubilizzati con ammoniaca o con acido cloridrico.

3. REATTIVI

3.1. Soluzione di potassio solfato acido al 10%

3.2. Acido cloridrico $d_{20}=1,19$, diluito 1:9 (v/v)

3.3. Ammoniaca al 37% diluita 1:9 (v/v)

3.4. Fibre di lana di pecora sgrassata

3.5. Soluzione di sodio idrossido al 5%

3.6. Soluzione di ammoniaca al 5%

Sgrassare le fibre di lana non candeggiate per estrazione in un apparecchio di Soxhlet con etere di petrolio (p.e. 40-60°C) (25-30 passaggi). Dopo asciugata, la lana viene fatta bollire per 30 min in un bicchiere con soluzione di sodio idrossido (3.5) e poi immersa per 1 h in una soluzione di ammoniaca (3.6) a 80°C. La lana viene quindi accuratamente lavata con acqua ed asciugata all'aria. Le fibre sgrassate non devono essere toccate con le mani.

5. MODO DI OPERARE

Una soluzione o sospensione ottenuta come descritto nella parte speciale, si neutralizza, se necessario, con ammoniaca (3.3), si aggiungono 5 ml di potassio solfato acido (3.1) e si scalda all'ebollizione su b.m. immergendovi un fiocco di lana bianca sgrassata (3.4). Dopo 5-15 min si estrae la lana e si lava con acqua; si acidifica quindi la soluzione con 3-4 gocce di acido cloridrico (3.2) per ogni 100 ml di soluzione e si scalda ancora per 10-20 minuti immergendovi un nuovo fiocco di lana. La presenza di coloranti artificiali è indicata dalla colorazione che la lana assume dopo questi trattamenti. I coloranti basici sono meglio fissati dalla lana in

ambiente neutro o debolmente ammoniacale e sono evidenti sul primo fiocco. I coloranti acidi vengono fissati in soluzione neutra o meglio in soluzioni acide. Nel caso che il fiocco di lana, trattato in soluzione neutra o acida, indichi la presenza di coloranti acidi, lo si lava bene con acqua e quindi lo si fa bollire per pochi minuti in una capsula immerso in una soluzione di ammoniaca (3.6). Si toglie il fiocco di lana, strizzandolo per raccogliere il liquido aderente. Si travasa il liquido in capsula di porcellana, si porta a secco su b.m., si riprende con poche gocce d'acqua. In presenza di coloranti acidi la soluzione appare colorata.

25. - Identificazione dei coloranti artificiali

1. OGGETTO

Il metodo permette la identificazione dei coloranti artificiali.

2. PRINCIPIO

I coloranti artificiali vengono fissati su lana, solubilizzati con soluzione diluita di ammoniaca e separati per cromatografia su strato sottile.

3. REATTIVI

Tutti quelli previsti al metodo precedente da (3.1) a (3.4).

3.5. Eluente I:

Soluzione di sodio citrato (tribasico) 2% in ammoniaca al 5%. L'eluente deve essere preparato di fresco.

3.6. Eluente II:

Alcool butilico terziario, acido propionico, soluzione allo 0,4% di potassio cloruro (50:12:3) v/v.

3.7. Standard: Rosso naftolo e Azorubina S. (soluzione alcolica 1%).

3.8. Cellulosa MN300 per TLC oppure lastre pronte all'uso stratificate con la stessa (spessore 0,25 mm).

4. APPARECCHIATURA

4.1. Apparecchiatura per TLC

4.2. Camera di sviluppo

4.3. Microsiringhe da 50 µl

4.4. Soffieria ad aria calda e fredda

5. METODO DI OPERARE

5.1. Separazione dei coloranti per TLC: 20 µl della soluzione preparata come nel metodo precedente vengono depositati sulle lastre (3.8) ad una distanza di 2 cm dal bordo inferiore. A fianco si depositano analogamente 5 µl delle soluzioni standard contenenti i coloranti probabilmente presenti.

Si pone la lastra nella camera di sviluppo (4.2) saturata previamente con la miscela eluente e si sviluppa con l'eluente I (3.5) fino a circa 1 cm dal bordo superiore.

Le stesse operazioni sono effettuate con l'eluente II (3.6).

Si asciugano le lastre in corrente d'aria calda (4.4) e si confronta la posizione delle macchie separate con quelle della miscela standard.

N.B. Con l'eluente II (3.6) lo sviluppo deve essere effettuato al buio a temperatura di 20°C.

26. - Ricerca ed identificazione dei coloranti naturali

1. OGGETTO

I metodi descritti consentono di identificare i coloranti naturali idrosolubili (antociani, betanina, flavonoidi, ecc.) e liposolubili (carotenoidi, clorofille, ecc.).

A) - COLORANTI IDROSOLUBILI

2. PRINCIPIO

I coloranti idrosolubili sono estratti con una soluzione metanolica di acido cloridrico, quindi separati per TLC ed identificati.

3. REATTIVI

3.1. Soluzione di acido cloridrico in metanolo all'1%

3.2. Cellulosa microcristallina per TLC o lastre già pronte (spessore 0.1 mm)

3.3. Resina a scambio cationico forte Dowex 50 W o similare

3.4. Eluente I: Isopropanolo, etanolo, acido formico, acqua (40:35:5:30) v/v

3.5. Eluente II: metanolo, acido cloridrico (d_{20}=1,19) (98:2) v/v

3.6. Soluzione standard: enocianina, betanina e altri antociani all'1% in metanolo

3.7. Ammoniaca 25% (d_{20}=0,91)

4. APPARECCHIATURA

4.1. Apparecchiatura per TLC

4.3. Microsiringa da 50 µl

4.4. Centrifuga da laboratorio con provette da 100 ml

4.5. Omogeneizzatore

4.6. Evaporatore rotativo sotto vuoto

4.7. Bombola di azoto

5. MODO DI OPERARE

Estrazione

Tutte le operazioni vanno effettuate a luce ridotta.

5.1. Sostanze liquide

10 g di prodotto sono addizionati con ca 50 ml di soluzione (3.1). Si lascia riposare per ca un'ora. Si centrifuga (4.4) per 10 min. Si raccoglie il surnatante in matraccio da 250 ml previa filtrazione su lana di vetro. Si lava ripetutamente il residuo per centrifugazione fino a completa decolorazione raccogliendo i surnatanti nello stesso matraccio e si porta a volume. Si prosegue come in (5.3) nel caso di succhi o prodotti zuccherini oppure direttamente come in (5.4).

5.2. Sostanze solide

10 g di prodotto sono addizionati di circa 50 ml della soluzione di acido cloridrico (3.1) ed omogeneizzati per qualche minuto, lasciati riposare e quindi centrifugati (4.4) per 10 min. Si raccoglie il surnatante in matraccio da 250 ml previa filtrazione su lana di vetro. Sul residuo si ripete l'estrazione fino a completa decolorazione raccogliendo gli estratti nello stesso matraccio; quindi si porta a volume. Si prosegue come in (5.4).

5.3. Per succhi e prodotti zuccherini conviene prima allontanare l'eccesso di zuccheri. 25 ml di estratto si portano con NaOH 0.1 M a pH 6 e si

fanno percolare su colonna di resina scambiatrice (3.3). Si allontanano gli zuccheri per ulteriore lavaggio con circa 50 ml di acqua, quindi si recuperano i pigmenti eluendo con una soluzione all'1% di HCl in metanolo fino a decolorazione.

5.4. 25 ml di estratto sono concentrati sottovuoto con evaporatore rotativo (4.6) fino a qualche ml. Da 10 a 25 µl (a seconda dell'intensità di colore del concentrato) sono depositati a circa 2 cm dal bordo inferiore della lastra ed essiccati in corrente di azoto (4.7). A fianco si depongono le soluzioni standard. Si sviluppa al buio con l'eluente I (3.4) fino a che il fronte è avanzato di circa 6 cm. Dopo essiccamento in corrente di azoto (4.7) la lastra viene sviluppata in un'altra camera di sviluppo con l'eluente II (3.5). Dopo essiccamento in corrente di azoto, le macchie separate si confrontano con gli standard. Gli antociani possono essere distinti dalla betanina esponendo la lastra a vapori di ammoniaca (3.7).
Gli antociani virano al blu, mentre la betanina rimane viola.

B) - COLORANTI LIPOSOLUBILI

2. PRINCIPIO

I coloranti liposolubili sono estratti con miscela di acetone ed etere di petrolio, quindi separati per TLC ed identificati.

3. REATTIVI

3.1. Etere di petrolio p.e. 40-60°C

3.2. Acetone

3.3. Eluente: etere di petrolio (p.e. 40°-60°C), acetato di etile, metanolo (70:25:5) v/v

3.4. Gel di silice G per TLC o lastre già pronte (spessore 0,25 mm)

3.5. Sodio solfato anidro

3.6. Ammonio solfato (soluzione satura)

3.7. Soluzione standard di β-carotene, clorofille ed altri carotenoidi all'1% in etere di petrolio (3.1).

Come standard si può anche usare un estratto di spinaci preparato secondo (5.2).

4. APPARECCHIATURA

4.1. Apparecchiatura per TLC

4.2. Camera di sviluppo

4.3. Microsiringa da 50 µl

4.4. Centrifuga da laboratorio con provette da 100 ml

4.5. Omogeneizzatore

4.6. Imbuto separatore da 500 ml

4.7. Evaporatore rotativo sotto vuoto

4.8. Bombola di azoto

5. MODO DI OPERARE

Tutte le operazioni devono essere effettuate a luce ridotta.

5.1. Sostanze liquide

10 g di liquido diluito a 200 ml con soluzione (3.6) sono estratti ripetutamente in imbuto separatore con porzioni di 50 ml di etere di petrolio (3.1) fino a completa decolorazione dello strato inferiore. Si procede quindi come in (5.3).

5.2. Sostanze solide

10 g di prodotto sono addizionati di circa 25 ml di acetone (3.2) omogeneizzati (4.5) in corrente di azoto (4.8) per qualche minuto e quindi centrifugati (4.4) per 10 minuti. Si raccoglie il surnatante in imbuto separatore (4.6) contenente etere di petrolio (3.1) stratificato sulla soluzione (3.6) e si ripete l'estrazione sul residuo fino a decolorazione completa. Gli estratti si diluiscono con soluzione satura di solfato di ammonio (3.6), si lasciano stratificare e si scarta la fase acquosa.

5.3. La fase eterea viene filtrata su filtro a pieghe contenente sodio solfato anidro (3.5). Il filtrato viene concentrato in evaporatore rotativo (4.7) fino a qualche ml (a seconda dell'intensità del colore).

20-30 µl vengono depositati in striscia sottile sulla lastra a circa

2 cm dal bordo inferiore, sono essiccati in corrente di ázoto (4.8); a fianco, sulla stessa lastra, si depositano le soluzioni standard. Si sviluppa con l'eluente (3.3) nella camera di sviluppo (4.1) al buio fino a che il fronte è avanzato di circa 10 cm. I relativi pigmenti vengono identificati dal loro caratteristico colore dopo essiccamento in corrente di azoto (4.8) della lastra.

Ordine di sviluppo sulla lastra a partire dal fronte del solvente:

β-carotene	(Rf = 0.95) arancio
criptoxantine	(Rf=fra 0.80 e 0.85) giallo-arancio
apocarotenale	(Rf=0.80) arancio
feofitina a	(Rf = 0.70) grigio
feofitina b	(Rf = 0.61) bruno
cantaxantina	(Rf = 0.58) giallo arancio
clorofilla a	(Rf = 0.45) verde bluastro
clorofilla b	(Rf = 0.40) verde oliva
luteina	(Rf = 0.20) giallo arancio
altre xantofille (violaxantina etc.)	(Rf = 0.10-0.20) giallo arancio di diverse gradazioni

27. - Ricerca globale di alcuni conservanti

1. OGGETTO

Il metodo descritto consente di identificare contemporaneamente la presenza di acido sorbico, acido benzoico, acido p-idrossibenzoico e suoi esteri, acido p-clorobenzoico e acido salicilico.

2. PRINCIPIO

I conservanti vengono estratti con etere, separati per cromatografia su strato sottile (TLC) ed identificati nell'UV.

3. REATTIVI

3.1. Poliammide in polvere per TLC

3.2. Indicatore fluorescente UV 254

3.3. Miscela etere di petrolio (p.e. 40-60°C) - Etere etilico (1:1) v:v

3.4. Etanolo 96% (v:v)

3.5. Metanolo

3.6. Acetone

3.7. Benzene

3.8. Acido acetico glaciale

3.9. n-pentano, per cromatografia (p.e. 34°-36°C)

3.10. n-esano, per cromatografia (p.e. 68°-69°C)

3.11. Sodio solfato anidro

3.12. Sodio carbonato acido

3.13. Acido solforico ca. 20%

3.14. Eluente A per la separazione degli acidi: benzene, acetone, acido acetico glaciale (60:30:1) v:v

3.15. Eluente B per la separazione degli esteri dell'acido p-idrossibenzoico: n-pentano, n-esano, acido acetico (10:10:3) v:v

Il n-pentano e il n-esano possono essere sostituiti da etere di petrolio con p.e. compreso nei limiti sopra riportati.

3.16. Soluzioni di riferimento: soluzioni alcoliche diverse contenenti ciascuna 0,1% di acido sorbico, acido clorobenzoico, acido salicilico, acido p-idrossibenzoico e suoi esteri. Soluzione alcolica allo 0,2% di acido benzoico.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Attrezzatura base per cromatografia su strato sottile costituita da:

- stratificatore
- piastra TLC 20x20 cm oppure 20x5 cm

Le piastre con indicatore fluorescente incorporato si trovano già pronte in commercio.

Mescolare intimamente, dopo essiccazione, 12 g di polvere di poliammide (3.1) con 0.3 g di indicatore (3.2). Aggiungere 60 ml di metanolo (3.5) e agitare fortemente. Stendere la miscela sulle piastre per uno spessore di 0,25 mm. Lasciare asciugare a temperatura ambiente.

- Camera di sviluppo

4.2. Micropipette

4.3. Lampada UV con doppio campo spettrale a 254 nm e 350 nm (o due lampade separate).

4.4. Soffieria ad aria calda e fredda.

5. MODO DI OPERARE

Omogeneizzare 50 g di prodotto disperdendolo in acqua se necessario. Acidificare con 10 ml di acido solforico (3.13) ed estrarre in imbuto separatore per 3 volte con porzioni di 20 ml ciascuna della miscela di etere etilico ed etere di petrolio (3.3). Riunire gli estratti eterei e lavarli con pochi ml di acqua. Essiccare su sodio solfato (3.11), filtrare ed eliminare la maggior parte del solvente per evaporazione su b.m.; i rimanenti 2-3 ml di solvente sono rimossi a temperatura ambiente con una leggera corrente d'aria. Sciogliere il residuo con 1 ml di etanolo (3.4); depositare 3-5 µl sulla piastra in macchie o striscie. Depositare contemporaneamente sulla stessa piastra 3 µl delle soluzioni di riferimento (3.16). Porre la piastra

nella camera di sviluppo presaturata con l'eluente A (3.14) ed eluire fino a 5 cm ca. dal bordo superiore. Asciugare a temperatura ambiente. Preparare in modo analogo una seconda piastra ed eluire in altra camera con l'eluente B (3.15) come precedentemente descritto.

Porre le piastre sotto la lampada U.V. (4.3) a 254 nm. L'acido salicilico appare come una macchia blu brillante mentre gli altri conservanti come macchie brune su fondo giallo-verde fluorescente. I valori orientativi di Rf sono i seguenti:

Valori di Rf	Eluente A	Eluente B
Acido sorbico	47	89
Acido benzoico	40	83
Acido p-clorobenzoico	32	80
Acido p-idrossibenzoico	3	4
Acido salicilico	8	26
p-idrossibenzoato di metile	24	8
p-idrossibenzoato di etile	32	12
p-idrossibenzoato di propile	36	15
p-idrossibenzoato di butile	41	19

28, - Determinazione degli acidi benzoico e sorbico mediante HPLC (in assenza di p-idrossibenzoato)

1. OGGETTO

Il metodo permette il dosaggio contemporaneo degli acidi benzoico e sorbico in assenza di p-idrossibenzoati.

2. PRINCIPIO

Separazione e dosaggio mediante cromatografia liquida ad alta pressione.

3. REATTIVI

3.1. Solvente di estrazione per campioni solidi e semisolidi: soluzione idroalcolica allo 0,5% di acido metafosforico: sciogliere 5 g di acido metafosforico in 250 ml di acqua e portare a 1000 ml con etanolo 95% (v:v).

3.2. Eluente: Soluzione tampone a pH 7: sciogliere 2,5 g di potassio fosfato bibasico triidrato ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) e 2,5 g di potassio fosfato monobasico (KH_2PO_4) in acqua e portare a 1000 ml. Filtrare sotto vuoto su filtro di cellulosa (4.2).

3.3. Standard

3.3.1. Per campioni liquidi: soluzione acquosa contenente 100 ppm di acido benzoico + 100 ppm di acido sorbico.

3.3.2. Per campioni solidi: soluzione in solvente di estrazione (3.1) contenente 100 ppm di acido benzoico + 100 ppm di acido sorbico).

4. APPARECCHIATURA

4.1. Apparecchio per HPLC costituito da:

- Pompa a pressione regolabile
- Valvola d'iniezione a loop
- Rivelatore spettrofotometrico con possibilità di lettura a 235 nm
- Colonna per HPLC impaccata con fase inversa silice-ottodecilsilano (C_{18})
- Registratore con eventuale sistema di integrazione

4.2. Sistema per filtrazione sotto vuoto dell'eluente costituito da:

- Pompa da vuoto ad acqua
- Beuta per filtrazione sotto vuoto a smerigliatura normalizzata
- Imbuto con gambo a smerigliatura normalizzata e setto poroso
- Filtri in cellulosa con porosità di 0.45 µm

4.3. Siringa per microfiltrazioni di campioni con filtri di cellulosa intercambiabili, porosità 0,45 µm.

5. MODO DI OPERARE

5.1. Prodotti liquidi: filtrare mediante la siringa (4.3) 10 ml di campione. Proseguire come indicato in (5.3).

5.2. Prodotti solidi: omogeneizzare 5-10 g di campione esattamente pesati, con 50-60 ml di soluzione idroalcolica di acido metafosforico (3.1). Portare quantitativamente al volume finale di 100 ml. Filtrare prima con filtro a pieghe e successivamente un'aliquota con la siringa (4.3). Proseguire come indicato in (5.3).

5.3. Iniettare 25 µl del filtrato con flusso dell'eluente (3.2) di 2 ml/min. Effettuare la rivelazione alla lunghezza d'onda di 235 nm. Iniettare nelle stesse condizioni operative 25 µl della soluzione standard (3.3.1 o 3.3.2) secondo i casi. Identificare gli antifermentativi dal loro tempo di ritenzione secondo la sequenza: acido benzoico, acido sorbico.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La concentrazione per singolo antifermentativo è data da:

$$C = \frac{A \ Cst \ d}{Ast}$$

dove:

C = concentrazione in ppm dell'antifermentativo nel campione

A = area del picco relativo all'antifermentativo nel cromatogramma del campione

Cst = concentrazione in ppm dell'antifermentativo nello standard

d = diluizione del campione

Ast = area del picco relativo all'antifermentativo nel cromatogramma dello standard.

29. - Determinazione degli esteri dell'acido p-idrossibenzoico mediante HPLC

1. OGGETTO

Il metodo permette il dosaggio contemporaneo degli esteri metilico, etilico e propilico dell'acido p-idrossibenzoico anche in presenza di acido sorbico e acido benzoico.

2. PRINCIPIO

Separazione e dosaggio mediante cromatografia liquida ad alta pressione.

3. REATTIVI

3.1. Solvente di estrazione per campioni solidi e semisolidi: Soluzione idroalcolica allo 0,5% di acido metafosforico: sciogliere 5 g di acido metafosforico in 250 ml di acqua e portare a 1000 ml con etanolo 95% (v:v).

3.2. Eluenti: fase mobile A - Soluzione tampone fosfato pH 7: sciogliere 2,5 g di potassio fosfato bibasico triidrato ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) e 2,5 g di potassio fosfato monobasico (KH_2PO_4) in acqua e portare a 1000 ml. Filtrare sottovuoto con filtro di cellulosa (4.2).

Fase mobile B: metanolo purissimo per HPLC.

3.3. Standard: Soluzione alcolica contenente 100 ppm di acido benzoico + 100 ppm di acido sorbico + 100 ppm di p-idrossibenzoato di metile + 100 ppm di p-idrossibenzoato di etile + 100 ppm di p-idrossibenzoato di propile.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Apparecchio per HPLC costituito da:

- programmatore di gradiente
- pompa doppia a pressione regolabile (oppure due pompe singole a pressione regolabile)
- Rivelatore spettrofotometrico con lettura 235 nm
- Colonna per HPLC impaccata con fase inversa silice-ottodecilsilano (C_{18})
- Registratore con eventuale sistema di integrazione

4.2. Sistema per filtrazione sottovuoto dell'eluente costituito da:

- Pompa da vuoto ad acqua
- Beuta per filtrazione sottovuoto a smerigliatura normalizzata
- Imbuto con gambo a smerigliatura normalizzata e setto poroso
- Filtri in cellulosa con porosità di 0,45 µm

4.3. Siringa per microfiltrazione di campioni con filtri di cellulosa intercambiabili, porosità 0,45 µm

5. MODO DI OPERARE

5.1. Prodotti liquidi: filtrare mediante la siringa (4.3) 10 ml di campione. Proseguire come indicato in 5.3.

5.2. Prodotti solidi: omogeneizzare 5-10 g di campione esattamente pesati, con 50-60 ml di soluzione idroalcolica di acido metafosforico (3.1). Portare quantitativamente al volume finale di 100 ml. Filtrare prima con un filtro a pieghe e successivamente una aliquota con la siringa (4.3). Proseguire come indicato in 5.3.

5.3. Determinazione: iniettare 25 µl del filtrato. Effettuare la rivelazione alla lunghezza d'onda di 235 nm. Iniettare nelle stesse condizioni operative 25 µl della soluzione standard (3.3). Identificare gli antifermentativi dal loro tempo di ritenzione.

5.3.1. Analisi dei p-idrossibenzoati in assenza di acido sorbico e acido benzoico.

Eluizione isocratica con miscela delle fasi mobili A e B (40:60), velocità di flusso 1,2 ml al minuto. Entro 8-10 minuti si separano nell'ordine: p-idrossibenzoato di metile, p-idrossibenzoato di etile, p-idrossibenzoato di propile.

5.3.2. Analisi dei p-idrossibenzoati, in presenza di acido benzoico e acido sorbico.

Eluizione in gradiente lineare della miscela delle fasi mobili con

B crescente dal 20% all'80% entro un minuto, velocità di flusso 2 ml/min. Entro 8-10 minuti si separano nell'ordine acido benzoico, acido sorbico, p-idrossibenzoato di metile, p-idrossibenzoato di etile, p-idrossibenzoato di propile.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La concentrazione per singolo antifermentativo è data da:

$$C = \frac{A \ Cst \ d}{Ast}$$

dove:

C = concentrazione in ppm dell'antifermentativo nel campione

A = area del picco relativo all'antifermentativo nel cromatogramma del campione

Cst= concentrazione in ppm dell'antifermentativo nello standard

d = diluizione del campione

Ast = area del picco relativa all'antifermentativo nel cromatogramma dello standard.

30. - Determinazione dell'anidride solforosa

1. OGGETTO

I metodi sottoriportati permettono la determinazione dell'anidride solforosa in via generale (A) e nei prodotti disidratati in presenza di altri composti solforati volatili (B).

A. Determinazione dell'anidride solforosa per distillazione.

2. PRINCIPIO

Distillazione dell'anidride solforosa e sua titolazione dopo ossidazione ad acido solforico mediante acqua ossigenata.

3. REATTIVI

3.1. Acido cloridrico soluzione al 15%

3.2. Acqua ossigenata soluzione allo 0,2%, preparata diluendo il perossido d'idrogeno al 30% con acqua distillata

3.3. Metanolo puro per analisi

3.4. Sodio idrossido soluzione 0,1 M

3.5. Sodio idrossido soluzione 0,01 M

3.6. Indicatore misto, preparato nel seguente modo: 100 ml di soluzione alcolica di rosso di metile allo 0,03% sono mescolati con 100 ml di soluzione alcolica allo 0,05% di blu di metilene e filtrati. In ambiente acido si ha un viraggio al rosso, in ambiente alcalino al verde.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Apparecchio di distillazione secondo la figura 2

4.2. Bombola di azoto

4.3. Bottiglia di lavaggio

5. MODO DI OPERARE

20-50 g di campione sono spappolati in acqua distillata e introdotti nel pallone di distillazione, insieme con 50 ml di metanolo (3.3). Un'apertura laterale del pallone è collegata alla bombola dell'azoto (4.2), il gas proviene da una bombola con valvola di riduzione e passa attraverso la bottiglia di lavaggio (4.3) riempita con sodio idrossido (3.4); l'altra apertura laterale è chiusa con un imbuto separatore contenente 40 ml di acido cloridrico (3.1).

Nel recipiente di raccolta si mettono 10 ml di perossido d'idrogeno (3.2) e 60 ml di acqua, quindi alcune gocce dell'indicatore (3.6). Si titola con sodio idrossido (3.5) fino a viraggio al verde, quindi si collega il recipiente di raccolta all'apertura centrale del pallone, nonchè, per sicurezza, ad una bottiglia di lavaggio contenente anch'essa soluzione acquosa neutralizzata di perossido d'idrogeno.

All'inizio della distillazione si toglie il tappo smerigliato che si trova sul collettore, per il tempo di scorrimento dell'acido cloridrico (3.1). Dopo aver rimesso il tappo, si fa passare nell'apparecchio una corrente di azoto (4.2) e il liquido è riscaldato con una piccola fiamma fino all'ebollizione. Si prosegue l'ebollizione per 45 minuti. La corrente d'azoto (4.2) dev'essere abbastanza velo-

ce ma non tumultuosa.

Avvenuta la distillazione,si toglie il collettore lavando con acqua distillata il tubo che pesca nel collettore stesso. L'acido solforico formatosi per ossidazione dell'anidride solforosa è titolato con sodio idrossido (3.5) fino a ricomparsa della colorazione verde iniziale.

Prima di effettuare una nuova determinazione è indispensabile lavare l'apparecchio con una corrente d'azoto (4.2) per 5 o 10 minuti (in una prova in bianco il liquido nel recipiente di raccolta non deve cambiar colore).

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Si esprimono in anidride solforosa (SO_2) usando i fattori: 1 ml di NaOH 0,01 M = 0,32 mg SO_2.

B. <u>Determinazione dell'anidride solforosa per via colorimetrica</u>

2. PRINCIPIO

Reazione colorimetrica dell'anidride solforosa con la p-rosanilina decolorata.

3. REATTIVO

3.1. Soluzione di aldeide formica 0,015%: si prepara da una soluzione di aldeide formica al 40% mediante diluizione in due tempi: da 10 a 1000 e da 75 a 2000.

200
NS14
ø 18
NS28
300 ml
180
400
ø 40
15
38
870
NS29
140
50 ml
AZOTO
NS29
NS 14
NS 14
180
300 ml
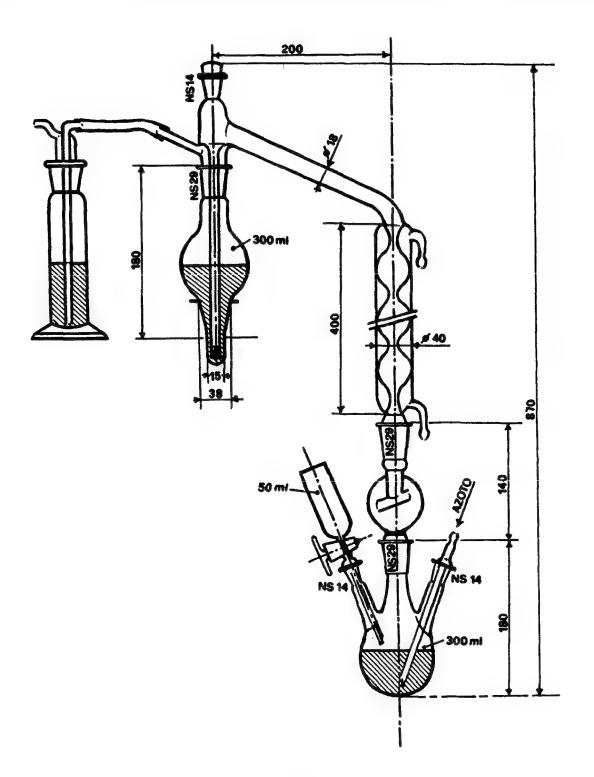
Figura 2

3.2. Soluzione di p-rosanilina cloridrato decolorata: porre 100 mg di p-rosanilina cloridrato e 200 ml di acqua in un matraccio tarato da 1000 ml; aggiungere 160 ml di acido cloridrico (1:1) (v/v) e portare a volume; lasciar riposare 12 h prima dell'uso.

3.3. Soluzione di sodio tetracloromercurato: porre 23,50 g di sodio cloruro e 54,30 g di mercurio cloruro (ico) in un matraccio tarato da 2000 ml; sciogliere in circa 1900 ml di acqua e portare a volume.

3.4. Soluzione standard di anidride solforosa: sciogliere circa 150 mg di sodio metabisolfito in acqua e portare a volume in un matraccio di 1000 ml; controllare il titolo dell'anidride solforosa con soluzione 0,005 M di iodio prima dell'uso (circa 100 mg SO_2/ml).

3.5. Soluzione di sodio idrossido 0,5 M

3.6. Soluzione di iodio 0,005 M

3.7. Soluzione di acido solforico 0,25 M

4. APPARECCHIATURA

4.1. Spettrofotometro UV-visibile oppure fotocolorimetro con filtro a 550 nm.

4.2. Omogeneizzatore

5. MODO DI OPERARE

5.1. Preparazione della curva di taratura:

Porre 5 ml di reagente al mercurio (3.3) in una serie di matracci da 100 ml; aggiungere poi 0,1,2,3... ml di soluzione standard di anidride solforosa (3.4), portare a volume ed agitare. Trasferire aliquote di 5 ml in tubi da saggio da 200 mm contenenti 5 ml di reagente alla p-rosanilina (3.2). Aggiungere 10 ml della soluzione di aldeide formica (3.1), agitare e tenere a temperatura ambiente per 30 min. Leggere l'assorbimento a 550 nm a confronto con il bianco e tracciare la curva di taratura.

5.2. Determinazione

Pesare 10$\pm$0,02 g di prodotto e porli in un omogeneizzatore (4.2) con 290 ml di acqua; coprire e mescolare per 2 min. Prelevare una porzione dell'omogeneizzato con una pipetta tarata da 10 ml a sgocciolamento e trasferire in un matraccio tarato da 100 ml contenente 4 ml di sodio idrossido (3.5). Agitare energicamente per 15-30 sec; aggiungere 4 ml di acido solforico (3.7) e 20 ml di reagente al mercurio (3.3) e portare a volume.

Per il bianco utilizzare 10 ml di acqua in sostituzione dell'estratto del campione.

Trasferire 2 ml della soluzione in esame in un tubo da saggio da 200 mm contenente 5 ml di reagente alla p-rosanilina (3.2); aggiungere 10

ml di soluzione di aldeide formica (3.1), mescolare e tenere 30min a temperatura ambiente. Leggere l'assorbimento a 550 nm contro il bianco (adoperando la medesima vaschetta per prove successive, occorre lavarla dopo ogni uso con acido cloridrico 1:1 (v/v) e acqua).

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Riferendosi alla curva di taratura convertire il risultato in ppm di anidride solforosa.

31. - DOSAGGIO DELLA NISINA PER DIFFUSIONE IN AGAR

1. OGGETTO

Il presente metodo consente di dosare la nisina addizionata agli alimenti e di differenziarla da altri inibenti eventualmente presenti.

2. PRINCIPIO

Il campione viene diluito con HCL 5 M; l'estratto viene quindi portato all'ebollizione, rapidamente raffreddato a t.a., e centrifugato. Il surnatante ottenuto dopo refrigerazione dell'estratto per solidificare la parte grassa, viene filtrato: l'attività antibiotica del campione è determinata misurando la diffusione della

nisina su un terreno agarizzato, insemenzato con Micrococcus flavus. La diffusione è rivelata dalla formazione di aloni di inibizione del microrganismo. Si ammette che il diametro di tali aloni sia direttamente proporzionale al logaritmo della concentrazione di antibiotico nel campo delle concentrazioni utilizzate.

Per dimostrare l'assenza di sostanze interferenti vengono effettuati i seguenti controlli: a) un'aliquota del surnatante viene sottoposta ad ulteriore ebollizione e saggiata; b) un'aliquota del surnatante viene portata a pH alcalino con NaOH, scaldata, riacidificata e sottoposta al saggio.

3. REATTIVI

3.1. Micrococcus flavus ATCC 10240*

3.1.1. Conservazione del ceppo

Insemenzare con Micrococcus flavus il terreno colturale (4.1) distribuito in provette a becco di clarino. Incubare a 30°C per 48 ore, conservare in frigorifero a 4°C e trapiantare ogni 15 giorni.

3.1.2. Preparazione della sospensione batterica

Lavare la patina di una coltura recente in agar a becco con 10 ml di soluzione Ringer a 1/4 (3.3). Misurare la trasmittanza luminosa

* ATCC = The American Culture Collection - 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852

della sospensione e diluire con (3.3) fino ad ottenere un valore del 50% (= 0,3 D.O.) misurato a 650 nm sotto lo spessore di 1 cm in confronto con la soluzione di Ringer a 1/4 (3.3).

3.2. Terreno di prova:*

Peptone	10,0 g
Lab. lemco	3,0 g
Sodio cloruro	3,0 g
Estratto di lievito	1,5 g
Agar	10,0 g
Zucchero di canna grezzo	1,0 g
Acqua distillata	1000 ml

pH 7,5 (prima della sterilizzazione).

3.3. Soluzione di Ringer 1/4:

Sodio cloruro	9,0 g
Potassio cloruro	0,42 g
Calcio cloruro anidro	0,24 g
Sodio bicarbonato	0,20 g
Acqua distillata	1000 ml

Ad una parte della soluzione aggiungere 3 parti di acqua distillata.

Sterilizzare a 121°C per 15 min.

* Si può usare qualsiasi terreno del commercio che dia gli stessi risultati

3.4. HCl 0,02 M

3.5. HCl 5 M

3.6. NaOH 5 M

3.7. Soluzione di Tween 20 al 50%

Tween 20 (poliossietilen-sorbitanmonolaurato)	50 ml
Acqua distillata	50 ml

Mantenere per 30 min a 50°C prima dell'uso.

3.8. Sostanza di riferimento: nisina ad attività nota (espressa in U.I.).*

3.8.1. Soluzioni di riferimento

Sciogliere in HCl 0,02 M (3.4) una quantità esattamente pesata della sostanza di riferimento (3.8); portare all'ebollizione in bagno maria bollente per 5 minuti, raffreddare rapidamente a 20±5° lasciar riposare 2 ore, indi diluire con HCl 0,02 M in modo da ottenere una soluzione madre contenente 1000 U.I. di nisina per ml. Se conservata in frigorifero in bottiglia chiusa questa soluzione è stabile per 7 gg. A partire da questa soluzione preparare per diluizioni successive (1:1) con l'estratto D (4.1) le seguenti soluzioni:

S_8	10	UI/ml
S_4	5	UI/ml

* 1 mg di nisina equivale a 1000 U.I.

S_2 2,5 UI/ml

S_1 1,25 UI/ml

4. MODO DI OPERARE

4.1. Preparazione degli estratti e delle soluzioni

Pesare 40 g del campione, aggiungere 160 ml di HCl (3.4) e agitare (Stomacher o altro omogeneizzatore) fino a completa dispersione. Portare il pH a 2 con HCl 5 M (3.5), indi porre in bagno maria bollente e mantenere per 5 minuti dal momento in cui il campione ha raggiunto almeno i 98°C.

Raffreddare rapidamente a 20°±5°C e portare il volume a 200 ml con HCl 0,02 M (3.4). Centrifugare per almeno 10 min a 2500 giri/min e porre il surnatante in frigorifero fino a solidificazione della fase grassa. Decantare la fase sottostante lo strato di grasso e filtrare su lana di vetro. (Estratto A).

Prelevare 20 ml dell'estratto A e porli in bagno maria bollente per 5 minuti; raffreddare rapidamente a 20°C ± 5° e portare a 200 ml con acqua distillata (Estratto B). Prelevare 60 ml dell'estratto A e portarli a pH 11 con NaOH 5 M (3.6); scaldare per 20 minuti a 63°C (o 2 ore a 44°C), raffreddare a 20°C±5° e portare a pH 2 con HCl 5 M (estratto C).

Prelevare 40 ml dell'estratto B ed addizionare 120 ml di HCl 0,02 M (Estratto D); questa soluzione viene usata come diluente sia per il

campione che per lo standard.

Preparare per diluizioni successive (1:1) le diluizioni del campione (Estratto A, B, C).

4.2. Dosaggio

4.2.1. Inoculazione del terreno di coltura

Il terreno di cui in 3.2 disciolto in bagno maria e raffreddato a 50°C viene addizionato del 2% della soluzione 3.7 ed insemenzato con il 2% della sospensione batterica di cui in 3.1.2. Agitare evitando la formazione di bolle; per rimuovere la schiuma eventualmente formatasi, il terreno insemenzato può essere mantenuto per qualche minuto a bagno maria a 48-50°C.

4.2.2. Preparazione delle piastre

La diffusione in agar si effettua su almeno 3 piastre con 4 concentrazioni della soluzione di riferimento (S_8, S_4, S_2, S_1), 4 concentrazioni del campione (Estratto A) e 4 concentrazioni del campione ritrattato al calore (Estratto B); su una piastra con le diluizioni del campione (Estratto A) e le concentrazioni del campione trattato a pH alcalino (Estratto C). A tale scopo utilizzare piastre di dimensioni tali che si possano praticare nel terreno agarizzato almeno 8 pozzetti del diametro di 10 mm, i cui centri non siano distanti tra loro meno di 30 mm.

Versare nelle piastre una quantità di terreno (3.2) insemenzato

come indicato in 4.2.1, che permetta di ottenere uno strato dello spessore di circa 3 mm.

Lasciare solidificare, praticare i pozzetti e disporvi dei volumi esattamente misurati della soluzione di riferimento del campione (Estratto A), del campione ritrattato termicamente (Estratto B) e del campione alcalinizzato (Estratto C).

4.2.3. Incubazione

Incubare le piastre per 16-18 ore a 30°C ± 2°C.

5. VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Misurare il diametro degli aloni di inibizione con l'approssimazione di 0,1 mm. Per ogni concentrazione, registrare le misure medie su carta semilogaritmica riportando il logaritmo delle concentrazioni in funzione del diametro dell'alone di inibizione. Tracciare le rette più appropriate per la soluzione di riferimento e per l'estratto procedendo ad esempio come segue.

Determinare il punto più appropriato per il livello più basso della soluzione di riferimento (SL) mediante la formula:

$$(a)\ SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Determinare il punto più appropriato per il livello più elevato della soluzione di riferimento (SH) mediante la formula:

$$(b)\ SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Determinare allo stesso modo i punti più appropriati per il campione al livello più basso (UL) ed al livello più alto (UH) sostituendo nelle formule sopra riportate i valori s_1, s_2, s_4 e s_8 con quelli di u_1, u_2, u_4 ed u_8.

Riportare i valori di SL ed SH sullo stesso grafico. Congiungendo i due punti si ottiene la retta più appropriata per la soluzione standard. Procedendo allo stesso modo per UL ed UH si ottiene la retta più appropriata per l'estratto.

In mancanza di interferenze, le rette dovrebbero essere parallele. In pratica, esse sono considerate parallele allorchè (SH - SL) ed (UH - UL) non differiscono fra loro di più del 10% della loro media.

Se le rette non sono parallele, è possibile eliminare sia u_1 ed s_1, sia u_8 e s_8. In questo caso, i valori SL, SH, UL ed UH che permettono di ottenere le rette più appropriate vanno calcolati mediante le formule seguenti:

$$(a)\ SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad o \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b)\ SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad o \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

e mediante formule analoghe per UL ed UH. Se si utilizza questa alternativa, bisogna verificare il parallelismo delle rette nel modo

sopra descritto. Se il risultato è stato ottenuto a partire da tre punti, ciò va indicato sul certificato di analisi.

Quando le rette sono considerate parallele, calcolare il logaritmo dell'attività relativa (log. A) con una delle formule seguenti:

$$(c)\ \log a = \frac{(u_1+u_2+u_4+u_8-s_1-s_2-s_4-s_8) \times 0{,}602}{u_4+u_8+s_4+s_8-u_1-u_2-s_1-s_2}$$

Per 3 punti

$$(d)\ \log.\ A = \frac{(u_1+u_2+u_4-s_1-s_2-s_4) \times 0{,}401}{u_4+s_4-u_1-s_1} \quad o$$

$$(d)\ \log.\ A = \frac{(u_2+u_4+u_8-s_2-s_4-s_8) \times 0{,}401}{u_8+s_8-u_2-s_2}$$

Attività dell'estratto del campione = attività dello standard corrispondente x A. ($U_8 = S_8 \times A$).

Se l'attività relativa si trova al di fuori della gamma di valori compresi fra 0,5 e 2,0 ripetere la determinazione procedendo ad opportune regolazioni delle concentrazioni dell'estratto o, eventualmente, delle soluzioni di riferimento. Quando tale attività non può essere ricondotta nella gamma di valore richiesta, il risultato deve essere considerato approssimativo e tale indicazione deve figurare sul certificato di analisi.

Allorché le rette non sono considerate parallele, ripetere la deter-

minazione. Se in base a questa nuova determinazione non è ancora possibile ottenere il parallelismo, la determinazione deve essere considerata insoddisfacente. Esprimere il risultato in mg di nisina/kg di alimento.

6. RIPETIBILITA'

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione dallo stesso analista non deve superare il 10% del risultato più elevato.

32. - Determinazione della Pectina

1. OGGETTO

Il metodo permette la determinazione della pectina solubile.

2. PRINCIPIO

La pectina, espressa come acido galatturonico o acido pectico, dopo opportune saponificazioni e precipitazioni viene determinata spettrofotometricamente con m-idrossidifenile.

3. REATTIVI

3.1. Etanolo al 95% v/v

3.2. Etanolo al 63% v/v

3.3. Sodio tetraborato 0,0125 M in H_2SO_4: sciogliere 0,4767 g di sodio tetraborato decaidrato in 100 ml di H_2SO_4 98% (d=1,84).

3.4. m-idrossidifenile: soluzione allo 0,15% in sodio idrossido allo 0,5%. La soluzione deve essere tenuta in frigorifero proteggendola dalla luce con un foglio di alluminio. Ha una durata di 20 giorni.

3.5. Acido D-galatturonico

3.6. Sodio idrossido 0,05 M

3.7. Sodio idrossido 1 M

4. APPARECCHIATURA

4.1. Spettrofotometro o colorimetro

4.2. Sistema filtrante Millipore sotto vuoto con filtro da 0,45 µm tipo HA

4.3. Agitatore per provette tipo Vortex

5. MODO DI OPERARE

5.1. Estrazione e purificazione delle pectine.

Una opportuna quantità di prodotto (avente un contenuto di acido galatturonico tra 50-400 mg) pesata e, se necessario omogeneizzata, viene miscelata con ca. 350 ml di acqua ed il tutto si fa bollire per 60 min, sostituendo con nuova acqua quella evaporata. Si trasferisce il tutto in un matraccio tarato da 500 ml, si raffredda, si porta a volume e si filtra.

10 ml di filtrato vengono aggiunti a 75 ml di etanolo (3.1) caldo. Si fa bollire per 15 min, si filtra sotto vuoto su Millipore (4.2) e si lava il residuo con 100 ml di etanolo (3.2).

Il residuo viene disciolto sul filtro con tre porzioni di ca. 30 ml di sodio idrossido (3.6); il filtrato, raccolto nella beuta sottostante, viene travasato quantitativamente in un palloncino tarato da 100 ml, aggiunto di 5 ml di sodio idrossido (3.7) e portato a volume. La soluzione viene lasciata a riposo per almeno 15 min prima di procedere alla reazione colorimetrica.

5.2. Reazione colorimetrica

Si introduce 1 ml della soluzione da analizzare in una provetta da 15 ml munita di tappo a vite, posta in un bagno refrigerato acqua-ghiaccio, dove viene lasciata per 15 min. Si aggiungono poi 6 ml di soluzione solforica di tetraborato (3.3) e si agita immediatamente la provetta con l'agitatore (4.3), rimettendola quindi nel bagno refrigerante e lasciandovela per 15 min. Dopo questa sosta, la provetta è trasferita in b.m. bollente (98 - 100°C) per 10 min, si riporta quindi nel bagno refrigerante per 15 min. Si aggiungono 0,1 ml di m-idrossidifenile (3.4) e si agita subito per 30 sec. con l'agitatore (4.3). Dopo una sosta di 15-20 min, fino alla completa scomparsa delle bollicine d'aria formatesi nell'agitazione, si legge l'estinzione della soluzione contro un bianco preparato nello stesso

modo mettendo al posto del campione 1 ml di acqua distillata. La lettura viene eseguita in vaschette di vetro di 1 cm di spessore, ad una lunghezza d'onda di 525 nm.

5.3. Curva di taratura

La curva di taratura si costruisce preparando una serie di soluzioni di acido D-galatturonico (3.5) nell'intervallo di concentrazione di 10-80 ppm. I relativi valori di estinzione si ricavano secondo la procedura descritta in 5.2.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La quantità in mg di acido galatturonico contenuta nel campione si ottiene moltiplicando per 5 il valore ottenuto nella reazione colorimetrica. La quantità deve essere riportata a 100 g di sostanza. Il valore di acido pectico si otterrà moltiplicando il risultato ottenuto per il fattore 0,907.

33. - Determinazione del cloruro di sodio

1. OGGETTO

Il metodo permette la determinazione del contenuto di cloruri espressi come cloruro di sodio.

2. PRINCIPIO

Il cloruro di sodio si determina secondo il metodo VOLHARD: i cloruri sono precipitati da un eccesso di nitrato d'argento che viene titolato con solfocianato di ammonio.

3. REATTIVI

3.1. Argento nitrato soluzione 0,1 M

3.2. Ammonio solfocianato soluzione 0,1 M

3.3. Acido nitrico concentrato (d_{20} = 1,40)

3.4. Soluzione satura di allume ferrico (indicatore)

5. MODO DI OPERARE

Pesare una parte aliquota del campione preparato, aggiungere 1 ml di acido nitrico concentrato (3.3) ed una quantità esattamente misurata di argento nitrato (3.1) in eccesso rispetto ai cloruri presenti.
Si scalda per far coagulare il cloruro di argento formatosi e si lascia raffreddare al buio (la coagulazione avviene anche a freddo per aggiunta di alcune gocce di nitrobenzene). Aggiungere alcuni ml di indicatore (3.4) e titolare con ammonio solfocianato (3.2) fino a colorazione rossa.

6. ESPRESSIONE DEL RISULTATO

Il valore in g del cloruro di sodio nella aliquota pesata è dato da

(N -n) x 0,005845

dove

N = ml di argento nitrato 0,1 M

n = ml di ammonio solfocianato 0,1 M

34. - Determinazione dei metalli

1. OGGETTO

Il metodo consente la determinazione di Cadmio, Calcio, Ferro, Piombo, Potassio, Rame, Sodio, Stagno e Zinco.

2. PRINCIPIO

La determinazione dei metalli è eseguita mediante Spettrofotometria di Assorbimento Atomico sul campione opportunamente preparato.

3. REATTIVI

3.1. Acido nitrico 65% ultrapuro

3.2. Soluzione di riferimento: soluzioni contenenti 1 mg/ml di Cd, Ca, Fe, Pb, K, Cu, Na, Sn, Zn.

3.3. Soluzione al 4% di cesio cloruro: sciogliere in acqua bidistillata 40 g di cesio cloruro e portare al volume di 1000 ml.

3.4. Soluzione al 5% di lantanio: sciogliere in acqua bidistillata 134 g di lantanio cloruro ($LaCl_3 .7 H_2O$) e portare al volume di 1000 ml.

3.5. Acido solforico conc. (d=1,84) ultrapuro.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Spettrofotometro A.A. con fornetto di grafite ed accessori

4.2. Capsule di platino Ø cm 10, altezza cm 3, fondo piatto.

4.3. Muffola e piastra riscaldante.

4.4. Lampada a radiazione infrarossa

4.5. Vetreria decontaminata

5. MODO DI OPERARE

5.1. Preparazione del campione

5.1.1. Mineralizzazione del campione

5.1.1.1. Digestione per via umida. Pesare 1-2 g del campione solido o comunque pastoso, secondo la presunta quantità di metallo, in un pallone Kjeldhal. Nel caso di prodotti liquidi pesare 10 g e concentrarli fino a piccolo volume (2-3 ml). Aggiungere 10 ml di acido nitrico (3.1) e 2,5 ml di acido solforico (3.5) ed iniziare quindi il riscaldamento in modo blando, protraendolo fino a comparsa di fumi bianchi. A questo punto la soluzione dovrebbe essere liquida ed incolore. Se ciò non si verifica, aggiungere

cautamente alcune gocce di acido nitrico (3.1) e riscaldare fino alla comparsa dei fumi bianchi. Completata la distruzione della sostanza organica, travasare la soluzione (il cui volume è ridotto a 2-3 ml) in un matraccio tarato da 25 ml e portare a volume con acqua bidistillata.

I campioni così preparati sono analizzati per confronto con le soluzioni standard al 10% di acido solforico (3.5).

5.1.1.2. Incenerimento per via secca. Pesare 5-10 g del campione, secondo la quantità di metallo presunta, in capsula di platino (4.2). Essiccare in muffola o su piastra riscaldante (4.3) o sotto lampada infrarossa (4.4) procedendo ad un riscaldamento cauto e graduale al fine di evitare perdite per fuoriuscite di materiale carbonioso. Porre il residuo in muffola già predisposta alla temperatura di 400°C ed incenerire per almeno 6 h. Nel caso del cadmio è opportuna l'aggiunta di alcune gocce di acido fosforico o solforico. Qualora le ceneri non fossero completamente bianche, umettare con poche gocce di acido nitrico (3.1), portare completamente a secco sotto lampada infrarossa (4.4) fino a scomparsa dei fumi bianchi e ripetere il trattamento in muffola per almeno 4 h. Riprendere le ceneri con 1 ml di acido nitrico (3.1), trasferire in matraccio tarato da 50 ml e portare a volume con acqua bidistillata.

5.1.2. Determinazione per via diretta

E' possibile effettuare direttamente, senza la mineralizzazione del campione, la determinazione di Na, K, Ca nei succhi o in altri prodotti liquidi. Eseguire la determinazione di Na e K, sia per i campioni, sia per gli standard , in presenza di cesio cloruro allo 0,4% diluendo la soluzione (3.3).

Eseguire la determinazione del Ca, in presenza di lantanio allo 0,5% diluendo la soluzione (3.4).

5.2. Determinazione

Diluire le soluzioni campione in modo che la concentrazione del metallo da analizzare sia compresa nell'intervallo di concentrazione della retta di taratura.

5.2.1. Cadmio λ = 228,8 nm

Temperatura di incenerimento 250°C

Temperatura di atomizzazione 2100°C

Compensatore di fondo

Preparazione della retta di taratura col metodo delle aggiunte

In tre matracci da 10 ml porre 5 ml della soluzione campione per ciascuno. Diluire la prima aliquota a 10 ml con acqua bidistillata.

Aggiungere alla seconda e alla terza rispettivamente 1 ml e 2 ml di una soluzione standard di cadmio alla concentrazione di 50 ppm e

portare entrambe al volume di 10 ml. Esse risulteranno addizionate rispettivamente di 5 e 10 ppm di cadmio (*).

Determinare l'assorbanza per ciascuna soluzione e costruire la retta di lavoro secondo il metodo delle aggiunte. La intercetta sull'asse delle concentrazioni rappresenta la concentrazione di cadmio nella soluzione del campione diluito.

5.2.2. Calcio λ = 422,7 nm

Fiamma: aria/acetilene

Compensatore di fondo

Preparazione della retta di taratura

Prendere 4 matracci da 10 ml e porre in ciascuno 1 ml di acido nitrico (3.1) ed 1 ml di una soluzione al 5% in lantanio (3.4). Introdurre, inoltre, in ciascun matraccio rispettivamente 0 ml, 1 ml, 3 ml, 5 ml di una soluzione contenente 10 ppm di calcio e portare quindi al volume di 10 ml con acqua bidistillata.

Determinare l'assorbanza per ciascuna soluzione e costruire la retta di taratura, dopo aver sottratto il valore del bianco da quelli degli standard..

(*) Tali indicazioni sono orientative e le quantità di cadmio da aggiungere sono rispettivamente uguali e doppie di quelle che si presumono contenute nella soluzione da analizzare.

5.2.3. Ferro λ = 248,3 nm

Fiamma: aria/acetilene

Compensatore di fondo

<u>Preparazione della retta di taratura</u>

Operare come in (5.2.6) utilizzando lo standard del Fe.

5.2.4. Piombo λ = 283,3 nm

Fornace di grafite

Temperatura di incenerimento 400°C

Temperatura di atomizzazione 2500°C

Compensatore di fondo

<u>Preparazione della retta di taratura col metodo delle aggiunte</u>

In 3 matracci da 10 ml porre 5 ml di soluzione campione per ciascuno. Diluire la prima aliquota a 10 ml con acqua bidistillata. Aggiungere alla seconda e alla terza aliquota rispettivamente 1 ml e 2 ml di una soluzione standard di piombo (3.2) alla concentrazione di 200 ppm e portare entrambe al volume di 10 ml. Queste due soluzioni risulteranno quindi, addizionate rispettivamente di 20 e 40 ppm.

Determinare l'assorbanza per ciascuna soluzione e costruire la retta di lavoro secondo il metodo delle aggiunte. La intercetta sull'asse delle concentrazioni rappresenta la concentrazione del piombo nella soluzione del campione diluito.

5.2.5. Potassio λ = 766,5 nm

Fiamma: aria/acetilene

Compensatore di fondo

Preparazione della retta di taratura

In 4 matracci da 50 ml porre su ciascuno 1 ml di acido nitrico (3.1) e 10 ml di una soluzione di cesio ottenuta per diluizione della soluzione (3.3). Introdurre quindi in ciascun matraccio rispettivamente 0 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml di una soluzione di potassio alla concentrazione di 5 ppm e portare al volume di 50 ml.
Le concentrazioni di potassio nei quattro matracci saranno rispettivamente 0 ppm, 0,50 ppm, 1,00 ppm, 2,00 ppm.
Determinare per ciascuna soluzione l'assorbanza e costruire la retta di taratura, dopo aver sottratto il valore del bianco da quello degli standard.

5.2.6. Rame λ = 324,8 nm

Fiamma: aria/acetilene

Compensatore di fondo

Preparazione della retta di taratura

In 4 matracci da 50 ml porre 1 ml di acido nitrico (3.1) e rispettivamente 0 ml, 5 ml, 15 ml, 25 ml, di una soluzione di rame alla concentrazione di 10 ppm e portare quindi a volume di 50 ml.
Le concentrazioni in rame nei 4 matracci saranno rispettivamente 0 ppm, 1 ppm, 3 pm , 5 ppm.

Determinare l'assorbanza per ciascuna soluzione e costruire la retta di taratura, dopo aver sottratto il valore del bianco da quello degli standard di rame.

5.2.7. Sodio λ = 589,0 nm

Fiamma: aria/acetilene

Compensatore di fondo

Preparazione della retta di taratura

Operare come in (5.2.5).

5.2.8. Stagno λ = 224,6 nm

Fornace di grafite

Temperatura di incenerimento 700°C

Temperatura di atomizzazione 2500°C

Compensatore di fondo

Preparazione della retta di taratura

In 4 matracci da 50 ml porre 1 ml di acido nitrico (3.1) per ciascuno e rispettivamente 0 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml di una soluzione di stagno alla concentrazione di 500 ppm e portare al volume di 50 ml. Le concentrazioni in stagno nei quattro matracci saranno rispettivamente 0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm.

Determinare l'assorbanza per ciascuna soluzione e costruire la retta di taratura, dopo aver sottratto il valore del bianco da quello degli standard di stagno.

5.2.9. Zinco λ = 213,8

Fiamma aria/acetilene

Compensatore di fondo

Preparazione della retta di taratura

In 4 matracci da 50 ml porre 1 ml di acido nitrico (3.1) per ciascuno e rispettivamente di 0 ppm, 0,25 ppm, 0,50 ppm, 1,00 ppm. Determinare l'assorbanza per ciascuna soluzione e costruire la retta di taratura, dopo aver sottratto il valore del bianco da quello degli standard di zinco.

AVVERTENZA

Diluire il campione in modo che la concentrazione del metallo da analizzare sia compresa nell'intervallo di concentrazioni della retta di taratura.

35. - Altre determinazioni

Per quanto riguarda altre determinazioni che dovessero essere effettuate (proteine, grassi, fibra grezza) si rimanda ai Metodi Ufficiali di Analisi dei Mangimi.

NOTE

AVVERTENZA:

Il testo delle note qui pubblicato è stato redatto ai sensi dell'art. 10, commi 2 e 3, del testo unico approvato con d.P.R. 18 dicembre 1985, n. 1092, al solo fine di facilitare la lettura delle disposizioni di legge modificate o alle quali è operato il rinvio. Restano invariati il valore e l'efficacia degli atti legislativi qui trascritti.

Note alle premesse:

— Il testo dell'art. 43 del R.D.L. n. 2033/1925 è il seguente:

«Art. 43. — Tutte le analisi occorrenti in applicazione del presente decreto saranno eseguite con i metodi ufficiali prescritti ed i relativi certificati saranno rilasciati in esenzione dalla tassa di bollo.

Occorrendo, i direttori di laboratorio dipendenti dallo Stato incaricati delle analisi potranno, per queste, avvalersi, sotto la loro responsabilità, di analizzatori di loro fiducia, i quali saranno compensati in ragione delle analisi eseguite, con i fondi messi a disposizione dei detti direttori per l'esecuzione del servizio».

— Il testo dell'art. 108 del R.D. n. 1361/1926 è il seguente:

«Art. 108. — Per le analisi dei prodotti e delle sostanze di cui al decreto-legge i laboratori devono adottare i metodi prescritti dal Ministero dell'economia nazionale, di concerto con quelli dell'interno e delle finanze. L'analizzatore però, al solo scopo di meglio convalidare il giudizio, può ricorrere anche ad altri metodi, ma di essi dovrà dar cenno nella sua relazione».

89A3049

GIUSEPPE MARZIALE, *direttore*

FRANCESCO NOCITA, *redattore*
ALFONSO ANDRIANI, *vice redattore*

(1651369) Roma - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - S.

(c. m. 411200891680)

L. 8.000